UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

Marina Bárbara Bastos Araújo Soares

Avaliação de consumo e preferência de álcool após procedimentos de indução de
dependência em ratos

SÃO PAULO

2017

MARINA BÁRBARA BASTOS ARAÚJO SOARES

Avaliação de consumo e preferência de álcool após procedimentos de indução de
dependência em ratos

Versão revisada

Dissertação apresentada ao Instituto de
Psicologia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Psicologia

Área de concentração: Psicologia
Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Miriam Garcia
Mijares.

SÃO PAULO

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação

Biblioteca Dante Moreira Leite

Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Soares, Marina Barbara B. A.

Avaliação de consumo e preferência após indução de dependência em ratos. / Marina Barbara B. A. Soares; orientadora Miriam Garcia Mijares. -- São Paulo, 2017.

71 f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Psicologia Experimental) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Álcool 2. Autoadministração 3. Consumo 4. Preferência 5. Dependência I. Título.

BF199.5

Marina Bárbara Bastos Araújo Soares

Avaliação de preferência e consumo de álcool após procedimentos de indução de dependência em ratos

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Psicologia

Área de concentração: Psicologia Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Miriam Garcia Mijares.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Ao Marcelo que buscou a liberdade até o fim.

“Querer-se livre é também querer os outros livres” - Simone Beauvoir

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais por terem apoiado mais um sonho meu. Por não terem medido esforços para me sustentar de todas as formas, em todos os momentos. Obrigada por sempre acreditarem em mim, por apostarem de que sou capaz, frente à dúvida de todos. Obrigada por me motivarem, por me compreenderem e por sofrerem ao meu lado.

Agradeço à Miriam por ter me dado esta oportunidade, por apostar, em tantos momentos, que era possível realizar este trabalho e por ter confiado no meu trabalho. Minha admiração e gratidão só aumentaram ao longo destes 4 anos. Obrigada por toda paciência e acolhimento em todos os meus desesperos e angústias. Obrigada pela discussão séria, pela revisão cuidadosa e pelo compromisso com a minha formação.

Agradeço ao Felipe Vieira, meu companheiro de vida. Obrigada por ter me apoiado em cada fase do trabalho. Obrigada pelo suporte emocional e pela compreensão infinita em cada parte desta jornada. Sem dúvidas, São Paulo jamais seria casa sem a sua presença e seu cuidado.

Agradeço à Ana por ter me ensinado a coletar e a questionar. Obrigada por me ensinar que tudo é relativo e transitório. Obrigada pela sua sabedoria!

Obrigada Talita pela sua ajuda em todos os sentidos, acadêmicos, pessoais, profissionais. Obrigada por ser tão acolhedora e tão prestativa!

Andeson, obrigada pela disponibilidade infinita, pelo compromisso acadêmico com a formação de seus colegas. Obrigada pelas manhãs de domingo com Skinner!

Obrigada Lígia, por ser um porto em meio ao caos! Obrigada por me ouvir, me ajudar, por ser uma companhia tão rica e tão agradável. Obrigada pelos questionamentos, pelas conversas e pelos horizontes maiores que a academia.

Agradeço aos colegas de laboratório, Yulla, Hernando, Rodrigo, Talita, Ana, William que foram essenciais neste trabalho. Obrigada por acolherem os meus desesperos e desânimos em nossas reuniões. Obrigada pelos ensinamentos, opiniões experimentais, socorro com a MED, com os ratos e com tantas outras coisas. O suporte cotidiano de vocês foi o que não me deixou desistir.

Agradeço ao Fábio e à Fernanda pelas discussões sobre o trabalho, pela disponibilidade, pelas sugestões.

Agradeço ao Celso e ao Jacob, técnicos do biotério, que me auxiliaram com os animais. Obrigada pelo apoio constante e paciente.

Obrigada Sônia por sempre me auxiliar de forma tão prestativa e eficiente com todas as burocracias e relatórios e prazos! Obrigada por tirar dúvidas, por sempre responder de forma solícita.

Agradeço ao Programa de Orientação e Atendimento a Dependentes que abriu um espaço de formação valiosa para que eu pudesse refletir sobre a dependência química de forma profunda e questionadora. Obrigada pelo abraço humano. Obrigada Sara, Júlia, Thaís e Thiago vocês sabem reconstruir vínculos despedaçados!

Agradeço a todos os professores que participaram da minha formação, que me fizeram crescer e sonhar. Obrigada, em especial, a Elisa Sanabio por me apresentar uma academia tão criativa e rica!

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Soares, M. B. B. A. (2017). Avaliação de consumo e preferência de álcool após procedimentos de indução de dependência em ratos. (Dissertação de Mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Vários procedimentos de indução ao alcoolismo em ratos têm sido desenvolvidos com a finalidade de produzir padrões de consumo de álcool. Muitos deles parecem ser eficientes em garantir a ingestão voluntária de altas doses de álcool por certo período de tempo, indicando a possibilidade de serem eficientes em induzir dependência de álcool de acordo com critérios como (aumento e escalada do consumo de álcool, sintomas de abstinência, comportamento de autoadministração resistente a punição). Entretanto, autores da Análise do Comportamento apontam que a dependência não seria considerada uma doença crônica, nem é apenas produto da ingestão da droga, mas seria fruto de processos comportamentais de escolha e que seria melhor descrita pela preferência pela droga sobre outros reforçadores concorrentes. O presente trabalho teve como objetivos avaliar e comparar os padrões de autoadministração e preferência por álcool de ratos submetidos a três procedimentos de indução de dependência reconhecidos pela literatura. No primeiro experimento o objetivo era a indução e avaliação da dependência de álcool por meio do procedimento de intubação intragástrica. Após realização de treino operante, os animais foram submetidos ao procedimento de intubação intragástrica, tal procedimento consistiu na infusão gástrica de solução de etanol 17,8 ml/kg, os animais receberam 10g/kg/dia. No segundo experimento o objetivo foi a indução a dependência de etanol por meio do procedimento operante em que os animais eram submetidos a sessões com duração de 14 horas cada, durante três vezes por semana. O esquema operante em vigor era CRF etanol 20% (v/v). No terceiro experimento foi realizado o procedimento de indução operante, em que, inicialmente, os animais respondiam a uma esquema CRF etanol 20% (v/v) durante 30 minutos diários. Depois dos procedimentos de indução os animais de cada experimento foram expostos a diferentes procedimentos de avaliação da escolha por etanol. No primeiro experimento, após a primeira fase de intubação intragástrica, os animais foram expostos a um esquema operante concorrente CRF etanol 10% (v/v) - CRF sacarose 14,7% (w/v). Na segunda fase do primeiro experimento, os animais foram expostos a um esquema operante concorrente FR2 etanol 10% (v/v) – FR2 sacarose 14,7% (w/v). No segundo experimento, foram realizadas duas fases para mensuração da preferência por etanol: a primeira consistiu em um esquema concorrente FR3 etanol 20% (v/v) – FR2 água; o segundo consistiu em um esquema operante FR3 etanol 20% (v/v) - FR3 sacarina 0,25% (w/v). No terceiro experimento, a mensuração da preferência por etanol se deu por meio de dois esquemas operantes concorrentes, o primeiro foi CRF etanol 20% (v/v) – CRF água, e o segundo foi CRF etanol 20% (v/v) – CRF sacarina 0,25% (w/v). Os animais consumiram doses ativas de etanol em todos os experimentos, entretanto, não apresentaram preferência por etanol quando este esteve concorrente à água, à sacarose 14,7% ou à sacarina 0,25%.

Palavras-chave: Dependência química. Escolha. Indução à dependência. Consumo de álcool. Alcool. Etanol.

ABSTRACT

Soares, M. B. B. A. (2017). Alcohol consumption and preference evaluation after induction addiction procedures in rats. (Dissertação de Mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Various alcohol induction procedures in rats have been developed to produce patterns of alcohol consumption. Many of them seems to be efficient at ensuring the voluntary intake of high doses of alcohol for a certain period of time, indicating the possibility of being efficient in inducing alcohol addiction according to criteria such as (increase and escalation of alcohol consumption, withdrawal symptoms, self-administration behavior resistant to punishment). However, Behavior Analysis authors point out that addiction should not be considered a chronic disease, nor is it just a product of drug intake, but would be the result of behavioral processes of choice and that would be better described by the drug preference over other competing reinforcers. The aim of this study was to evaluate and to compare the patterns of autoadministration and alcohol preference of rats submitted to three procedures of induction of addiction recognized in the literature. In the first experiment the objective was the induction and evaluation of alcohol addiction through the intragastric intubation procedure. After operant training, the animals were submitted to intragastric intubation procedure, such procedure consisted of gastric infusion of ethanol solution 17.8 ml/kg, the animals received 10g/kg/day. In the second experiment the objective was to induce ethanol addiction by means of the operant procedure in which the animals were submitted to sessions lasting 14 hours each, three times a week. The operant schedule was CRF 20% ethanol (v/v). In the third experiment the operant induction procedure was performed, initially animals responded to a 20% (v / v) CRF ethanol for 30 minutes daily. After the induction procedures, the animals from each experiment were exposed to different procedures for evaluating the preference for ethanol. In the first experiment, after the first phase of intragastric intubation, the animals were exposed to a concurrent operative schedule CRF ethanol 10% (v/v) - CRF sucrose 14.7% (w/v). In the second phase of the first experiment, the animals were exposed to a concurrent operant schedule FR2 10% (v/v) ethanol - FR2 sucrose 14.7% (w/v). In the second experiment, two phases were used to measure ethanol preference: the first consisted of a concurrent schedule FR3 ethanol 20% (v/v) - FR2 water; the second consisted of an operative scheme FR3 ethanol 20% (v/v) - FR3 saccharin 0.25% (w/v). In the third experiment, ethanol preference was measured by two concurrent operating schedules, the first one was CRF 20% (v/v) ethanol - CRF water, and the second was CRF ethanol 20% (v/v) CRF saccharin 0.25% (w/v). The animals consumed active doses of ethanol in all the experiments; however, they did not present preference for ethanol when it was in competition with water, 14.7% sucrose or 0.25% saccharin.

Keywords: Addiction. Choice. Induction to addiction. Alcohol consumption. Alcohol. Ethanol.

LISTA DE TABELAS

EXPERIMENTO I

Tabela 1 - Resumo das fases e procedimentos do experimento 1	37
Tabela 2 – Efeito relativo estimado da taxa de respostas por etanol e por sacarose, nas fases III e VI.	40
Tabela 3 – Efeitos relativos estimados para a preferência por etanol nas fases III (1 e 2) e VI (1 e 2), em dois dias de teste para as duas fases.	41

EXPERIMENTO II

Tabela 4 - Resumo de todas as fases e procedimentos do experimento 2.	47
Tabela 5 - Efeito relativo estimado do consumo de etanol (g/kg/min) durante as fases do experimento 02.	49
Tabela 6 – Efeitos relativos de tratamento da taxa de respostas durante as fases V e VI para etanol e para os concorrentes água e sacarina	50

EXPERIMENTO III

Tabela 7 - Resumo de todas as fases e procedimentos do experimento 3	55
Tabela 8 - Efeito relativo estimado do consumo de etanol (g/kg/min) ao longo das fases do experimento 03.	57
Tabela 9 – Efeito relativo da taxa de respostas nas fases III e V, em que o etanol esteve concorrente com a água e a sacarina, respectivamente.	58
Tabela 10 – Efeito relativo da preferência por etanol nas fases III e V, em que o etanol esteve concorrente com a água e a sacarina, respectivamente.	59

LISTA DE FIGURAS

EXPERIMENTO I

Figura 1 - Mediana do consumo de etanol (autoadministração) em g/kg ao longo do experimento 01.39

Figura 2 - Box (mediana, P25 e P75) & *whiskers* (P10 e P90) das Fases III e VI sobre às taxas de respostas pelo etanol e pela sacarose sob os esquemas concorrentes de cada fase (CRF ET10% x CRF Sac14,7% - fase III) e (FR2 ET10% x Sac14,7% - fase VI).40

Figura 3 - Box (mediana, P25 e P75) & *whiskers* (P10 e P90) das Fases III e VI da preferência por Etanol de ambas as CEPAS nas Fases III e VI.....41

EXPERIMENTO II

Figura 4 - Box & *whiskers* da mediana do consumo g/kg/min (A) e absoluto (B) de etanol entre os sujeitos, durante as fases do experimento 02.48

Figura 5 - Box & *whiskers* da taxa de respostas (respostas/minuto) nas fases V e VI, pelo etanol e pelos concorrentes, água e sacarina.49

Figura 6 - Diagramas box & *whiskers* dos resultados da preferência por etanol, nas fases V (concorrente à água) e VI (concorrente à sacarina).50

EXPERIMENTO III

Figura 7 - Box & *whiskers* da média de consumo de etanol em g/kg/min durante todas as fases do experimento 03.....57

Figura 8 - diagrama Box & *whiskers* das medianas da taxa de respostas sob o esquema concorrente, quando o etanol esteve concorrente com a água (Fase III) e quando esteve concorrente com a sacarina (Fase V)..58

Figura 9 - Box & *whiskers* medianas da preferência por etanol nas fases III (etanol concorrente com água) e V (etanol concorrente com sacarina).....59

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
MODELOS ANIMAIS DE DEPENDÊNCIA DE ÁLCOOL	15
PROCEDIMENTOS DE INDUÇÃO AOS COMPORTAMENTOS QUE CARACTERIZAM A DEPENDÊNCIA DE ÁLCOOL EM ANIMAIS.	22
Inalação.....	23
Administração oral.....	24
Método de indução operante.....	27
Intubação Gástrica	31
OBJETIVOS.....	33
EXPERIMENTO I.....	34
Método	34
Procedimento	35
Resultados.....	37
Discussão	41
EXPERIMENTO II	45
Método	45
Procedimento	46
Resultados.....	48
Discussão	51
EXPERIMENTO III	53
Método	53
Procedimento	54
Resultados.....	56
Discussão	60
DISCUSSÃO GERAL.....	61
REFERÊNCIAS	66

APÊNDICE69

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM V (APA, 2013) define dependência química baseando-se em um conjunto de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos, com duração de 12 meses ou mais, que indicam que o sujeito continua fazendo uso de substâncias em detrimento de prejuízos relacionados ao consumo destas. O manual descreve onze critérios diagnósticos da dependência química: a) tolerância, b) abstinência; c) consumo da substância para aliviar sintomas da abstinência; d) consumo da substância por períodos e quantidades maiores que as planejadas; e) desejo ou esforços mal sucedidos em diminuir ou controlar o consumo; f) muito tempo gasto em atividades para obtenção da substância, ou no seu uso, ou na recuperação de seus efeitos; g) diminuição de atividades sociais, h) laborais e recreativas em função do uso da substância; i) uso mesmo quando este produz problemas sociais e interpessoais; j) exposição a situações de risco; k) uso da substância em detrimento de consequências aversivas (problemas físicos ou psicológicos persistentes ou recorrentes que tendem a ser causados ou agravados pelo uso da substância); l) fissura importante. Neste modelo, a dependência química pode ser classificada em três estágios: dependência leve (presença de dois ou três dos onze critérios), dependência moderada (presença de quatro ou cinco dos onze critérios) e dependência severa (presença de mais de seis dos onze critérios).

Ainda que o DSM seja uma das ferramentas principais para se diagnosticar dependência (Hasin et al., 2013), a definição de dependência é ainda debatida na literatura, especialmente no que se refere à demarcação de qual ou quais dos comportamentos do adicto distinguiriam dependência do abuso ou do uso frequente de drogas. Nessa linha, Sussman e Sussman (2011) discutiram a definição do termo adicção a partir da revisão de 52 artigos e apontaram cinco elementos fundamentais: (a) comportamento de buscar efeitos apetitivos/reforçadores, (b) preocupação com tal comportamento, (c) satisfação temporária, (d) perda do controle, (e) sofrimento de consequências negativas. Para os autores, os mecanismos de tolerância e abstinência são pontos centrais para o desenvolvimento da dependência química. O maior efeito da dependência química é o aumento das consequências negativas produzidas pelo uso contínuo da droga. Assim, com o passar do tempo as consequências negativas tornam-se maiores do que as positivas e, ainda assim, o sujeito persiste no comportamento de uso da droga. Desta forma, há uma contradição do consumo de drogas, o mesmo sujeito que é reforçado positivamente pela droga, por meio dos efeitos que estas produzem, também tenta afastar-se do consumo para evitar as consequências negativas

produzidas pelo uso. Ou seja, o comportamento de uso de drogas é mantido pelas consequências positivas que produz (reforço positivo), e pelo alívio da abstinência (reforço negativo). Ao mesmo tempo em que este comportamento é punido por meio das consequências negativas que são produzidas.

O DSM V e Sussman e Sussman (2011) discutiram critérios observados em humanos, O'Brien e Gardner (2005) ampliaram a definição e estenderam os critérios de dependência química a serem observados em humanos e em experimentos com animais. Adição seria um transtorno comportamental, que apresenta modificações neurológicas específicas, caracterizado por: a) uso compulsivo da droga; autoadministração que persiste a despeito de consequências aversivas que são produzidas; e, b) fissura. Dentre estes, o principal seria o comportamento de consumo compulsivo da droga. Note-se que o critério “preocupação com o comportamento de uso de drogas”, presente em outras definições, não é incluída nesta, permitindo que a definição de dependência seja aplicada a animais.

Todas as definições discutidas acima tem como foco a descrição de critérios comportamentais que caracterizam a dependência química dos mais variados tipos de drogas. Desta forma, o alcoolismo, padrão comportamental que indica dependência do álcool, é definido sob esses critérios.

Tais critérios são importantes na definição, no diagnóstico, no tratamento, prevenção e em pesquisas sobre o alcoolismo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, 3.3 milhões de mortes por ano são causadas como consequência do uso nocivo de álcool, este número representa 5,9% de todas as mortes. Além dos danos de saúde, o uso nocivo de álcool causa prejuízos sociais e econômicos significativos (OMS, 2014). É com essa justificativa que uma série de pesquisas têm se focado em estudar as variáveis que determinam o uso e a dependência por álcool usando procedimentos experimentais de laboratório com animais.

Modelos animais de dependência de álcool

Modelos Comportamentais

Os modelos comportamentais animais em psicofarmacologia são ferramentas importantes para compreensão de determinados fenômenos, uma vez que paradigmas comportamentais e procedimentos utilizados servem, de algum modo, como modelos do comportamento humano (Willner, 1991). Entretanto, deve-se considerar a insuficiência dos modelos em replicar a realidade de forma exata. Para Willner (1991), existem três grandes

categorias de modelos comportamentais dentro da neuropsicofarmacologia, que são aqueles que investigam os processos cerebrais, processos psicológicos e ações de drogas.

Segundo Willner (1991), as simulações são modelos que utilizam animais para compreender processos mentais humanos. As simulações de comportamentos-problema predominam por razões sociais, financeiras, éticas e legais. Assim, um modelo animal de um comportamento-problema tenta simular um sintoma de um transtorno, grupo de sintomas, ou excepcionalmente, a síndrome completa, com objetivo de produzir estados comportamentais que possam ser usados como ferramentas de estudo dos aspectos do transtorno que está sendo modelado.

Há três facetas de validade para os modelos que são definidas de acordo com os comportamentos modelados que podem ser testados, são elas, validade de predição, validade de face e validade de constructo (Willner, 1991). A validade de predição tem como objetivo testar a resposta à drogas terapêuticas. A validade de face testa a similaridade fenomenológica entre o modelo e o transtorno. Na prática, não se pode exigir que a simulação corresponda em cada aspecto particular do transtorno simulado, pois uma das funções da simulação é a de compreender quais variáveis determinam o surgimento e a manutenção do transtorno (Willner, 1991). Além disto, em geral, a etiologia e a base fisiológica dos transtornos psiquiátricos são pouco conhecidas, fazendo com que a validade de face seja baseada nos sintomas primários (Willner, 1991). O acesso a validade de constructo é um processo de três estágios: 1) identificação da variável comportamental que está sendo modelada; 2) acesso ao grau de homologia (para que dois comportamentos sejam homólogos, eles devem compartilhar uma base fisiológica e ocorrer em contextos comportamentais similares) entre as variáveis identificadas e o comportamento simulado; 3) acesso à significância na variável identificada para o cenário clínico (Willner, 1991).

Neste contexto, os modelos animais de dependência de álcool devem seguir os mesmos princípios descritos para os modelos neuropsicofarmacológicos. Tais modelos são fundamentais porque auxiliam na compreensão do porquê e de que forma alguns indivíduos tornam-se adictos e como é possível reverter ou diminuir tal transtorno (Helms et al., 2015). Segundo Helms et al. (2015), uma imagem mais completa dos efeitos do alcoolismo no organismo pode ser compreendida por meio dos modelos comportamentais que capturam e reproduzem padrões de consumo buscando demonstrar as influências e os impactos nas funções do organismo.

Sanchis-Segura e Spanagel (2006) realizaram uma revisão de modelos animais de dependência ao álcool utilizados com frequência na pesquisa do alcoolismo, assumindo que a dependência é um fenômeno genuinamente humano, mas que certas características desta síndrome podem ser modeladas em laboratório. Os autores distinguiram os procedimentos que acessam a função reforçadora de drogas dos procedimentos que modelam ou simulam os comportamentos dependentes.

Dentro da primeira categoria, citam modelos de autoadministração, de preferência condicionada, estimulação intracraniana, dentre outros; na segunda categoria incluem todos os modelos considerados de procura e recaída. Procedimentos de escolha são incluídos na categoria de dependência quando o que é modelado é a “escolha pela droga a despeito das suas consequências negativas”, como por exemplo, um choque ou sabor amargo da droga, ou quando as escolhas sob esquemas concorrentes são realizadas após períodos de privação da droga.

Os procedimentos de autoadministração e escolha após período de privação serão apresentados com maior detalhe a seguir por serem de interesse para o presente trabalho.

Os procedimentos de autoadministração podem ser classificados como operantes e não operantes¹. Os procedimentos não operantes consistem na autoadministração oral de etanol, geralmente, na caixa viveiro. São dispostas garrafas com água e com diferentes concentrações de etanol e o que é medido é o consumo de etanol (em g/kg) e o consumo de água, além da medida de preferência entre os diferentes líquidos disponíveis. Segundo Sanchis-Segura e Spanagel (2006), este é um procedimento simples, que não exige equipamentos especiais, apresenta medidas fáceis de serem obtidas, entretanto, a interpretação dos dados pode ser mais elaborada, pois a análise pode extrapolar os dados quantitativos de consumo e preferência, mostrando outros padrões qualitativos que podem fornecer informações importantes sobre a autoadministração de drogas. Os procedimentos operantes consistem na disponibilidade da droga a partir da aprendizagem operante de contingências. Os procedimentos podem ser tanto de reforçamento positivo, quanto de reforçamento negativo. De acordo Sanchis-Segura e Spanagel (2006), ambos os modelos têm boa validade de face, excluem variáveis sociais e tem base fisiológica semelhante.

¹ É importante destacar que a denominação “operante” e “não operante” se refere a manipulação do experimentador e não ao comportamento do animal, pois em ambos os casos o que está sendo mantido é o controle da consequência droga sobre o comportamentos de autoadministração.

No modelo de produção do comportamento de recaída por meio da privação de droga períodos de privação da droga são impostos aos animais que já tiveram acesso voluntário por longo período à droga. Animais que já tiveram experiência prévia com a droga aumentam o consumo desta após o período de abstinência forçada, a isto é chamado de efeito da privação (Sanchis-Segura e Spanagel, 2006). Os autores relatam pesquisas de Spanagel et al., 1996 e Spanagel e Holter, 2000, em que o procedimento utilizado por eles consiste, inicialmente, na disponibilização de quatro garrafas contendo etanol em diferentes concentrações (0, 5%, 10% e 20%), nesta fase os animais tem livre acesso e consumo a estas soluções, durante vários meses são medidos o consumo e a preferência de cada animal. Em seguida, os animais ficam de 2 a 3 semanas privados de etanol. Quando os animais são novamente expostos a situação de livre escolha, geralmente, eles preferem a solução com maior concentração de etanol e apresentam padrões de consumo diferentes dos apresentados na primeira fase, consomem mais e durante a fase clara e escura do ciclo, sem diferenciações entre estas. O modelo de privação de álcool pode ser considerado um modelo de recaída porque mede autoadministração da droga após o período de abstinência. Este modelo apresenta validade de face e de constructo com o alcoolismo em humanos. Os autores também relatam que este modelo é compatível com a escalada do consumo (tendência do aumento no consumo mesmo diante variabilidade deste) e distúrbios circadianos presentes no alcoolismo em humanos. Ainda explicam que os dados de diferentes pesquisas apontam que o comportamento de consumir álcool após fases repetidas de privação é função da história individual do sujeito com o álcool. Outro dado informado pelos autores é que, em alguns sujeitos, fases de privação repetida levam ao desenvolvimento de características centrais de comportamentos de dependência como escalada do consumo, insensibilidade às consequências negativas ou a consequências reforçadoras alternativas ao álcool, assim como interferência do comportamento de consumo em outros comportamentos e em padrões fisiológicos (i.e., ciclo circadiano de atividade e de descanso). Por outro lado, a limitação deste modelo está na análise de apenas um comportamento (consumo/preferência), que não fornece toda a informação necessária sobre os mecanismos que estão envolvidos nos processos comportamentais de dependência.

Olmstead (2006) teve como foco a definição de dependência química que aponta a compulsão para obter e consumir a droga e a perda de controle sobre o consumo desta como sintomas centrais. A autora ressaltou que, apesar da dificuldade de produzir tais sintomas no

laboratório, como relatado por Sanchis-Segura e Spanagel (2006), é possível considerar que a medida de busca por drogas revela-se como boa medida de fissura no laboratório com animais. Além disto, apesar de pouco utilizado, os esquemas de escolha, em que há esquemas reforçadores concorrentes poderiam prover informações valiosas sobre o impacto de um reforçador alternativo, o trabalho para obter cada um deles, medidas que podem ser obtidas simultaneamente.

Fundamentado nas propostas que definem a dependência de drogas como comportamento de escolha (Herrnstein and Prelec, 1991; Heyman, 1996, 2009; Ainslie, 2000) e em uma vasta literatura experimental, Ahmed (2005) defendeu que a maioria dos modelos animais usados para estudar dependência, incluindo os de recaída, carecem de validade por não considerar o efeito de reforçadores concorrentes sobre os comportamentos de consumo e procura por drogas. O autor explica que, ainda que os principais comportamentos do dependente de drogas sejam observados em animais de laboratório (escalada do consumo de drogas, aumento da motivação para a droga, dificuldade para se abster, uso inflexível da droga), esses podem acontecer em função da falta de reforçadores positivos alternativos à droga, e em função da falta de consequências negativas ao seu uso (i.e, custos para o consumo da droga). Assim, afirmou que muitos animais parecem consumir drogas e, eventualmente tornam-se adictos, não apenas porque as drogas sejam intrinsicamente aditivas, mas muito mais em função de que as drogas são as únicas fontes significativas de reforço disponíveis no laboratório.

De acordo com Ahmed (2005), a alta prevalência de animais dependentes no laboratório não corresponde às taxas epidemiológicas de dependência na população humana. Tal fato revela que os animais de laboratório exibem maior risco para o desenvolvimento da dependência química pela condições de restrições presentes do laboratório: diferente dos humanos, os animais são privados de outros reforçadores positivos alternativos às drogas e são privados dos custos e das consequências negativas da ingestão destas. Assim, os animais exibiriam consumo compulsivo de droga em função da restrição de outros reforçadores e da ausência dos custos de punição.

Seguindo essa proposta, Ahmed (2010) construiu um modelo experimental animal que, de acordo com o autor, mais se aproxima da dependência química em humanos. O modelo parte da premissa que só com a disponibilidade de escolha entre a droga e um reforçador alternativo à droga é possível separar os animais dependentes daqueles que autoadministram

a droga apenas em função da ausência de outros reforçadores. O procedimento, de forma resumida, consistiu em induzir o consumo e a escalada do consumo de cocaína e, depois, apresentar solução de sacarina na concentração de 0,2% concorrente à cocaína, na caixa operante. Muitos dos animais escolheram a solução adoçada de sacarina, e apenas cerca de 10% dos sujeitos experimentais escolheram a cocaína e mantiveram altas taxas de consumo.

O comportamento de escolha é considerado por vários autores um critério definidor central para a dependência química. Esta é definida a partir da observação dos critérios de padrão de uso compulsivo, escolha praticamente exclusiva pela droga e uso apesar das consequências negativas que este produz (APA, 2013; Sussman e Sussman, 2011; O'Brien e Gardner, 2005). Ainda, as teorias atuais comportamentais e das neurociências concordam em apontar que a distribuição de comportamentos do adicto se caracteriza pela preferência quase exclusiva pela droga ou por reforçadores e estímulos com ela associados (Heyman, 2009, 2013; Piazza e Deroche-Gamonet, 2013; Volkow e Kalivas, 2005; Hyman, Malenka e Nestler, 2006; Bechara, 2005). Assim, em consonância com Ahmed (2005) muitos modelos animais de dependência química utilizam a preferência como uma medida relevante de dependência, uma vez que esta apresenta validade com os comportamentos de escolha por droga em humanos (Sanchis-Segura e Spanagel, 2006; Olmstead, 2006; Ahmed, 2005, 2010).

Heyman (1997) realizou uma pesquisa de escolha por álcool que tinha como objetivo responder a três questões: (a) se os animais continuariam consumindo níveis significantes de álcool adoçado com sacarina quando tivessem acesso à uma solução isocalórica de sacarose 14,2%; (b) se as respostas mantidas pela solução de etanol 10% adoçado com sacarina 0,25% seriam mais resistentes à mudanças do que respostas mantidas pela solução de sacarose 14,2%; e, (c) se haveria alguma evidência de que taxas de respostas iniciais poderiam explicar a persistência do responder reforçado por etanol adoçado. Para responder a tais questões realizou um procedimento para induzir o consumo de etanol. Neste procedimento, os animais realizavam sessões experimentais na caixa operante, uma barra operante disponibilizada água como consequência e a outra disponibilizava uma solução de etanol 2,5% adoçado com 10% de sacarose. Gradualmente, foi-se aumentando a concentração de etanol e diminuindo a concentração de sacarose (esse procedimento recebe na literatura o nome de indução por *fade in* de etanol e *fade out* de sacarose). Ao final da indução, os animais consumiam doses de 2,5 a 3 g/kg de etanol 10% adoçado com 0,25% de sacarina durante sessões experimentais de 30 minutos e as respostas pelo etanol eram estáveis. É

importante ressaltar que a manutenção de respostas pelo etanol foi mantida pela solução de etanol 10% adoçada com sacarina. Depois, os animais foram expostos a uma situação de escolha entre etanol 10% adoçado com 0,25% de sacarina concorrente a uma solução de sacarose isocalórica na concentração de 14,2%, inicialmente no esquema de reforçamento múltiplo VI5 – VI5. O esquema de reforçamento VI5 na barra em que estava a sacarose foi aumentado para 30s e depois para 90s. Houve reestabelecimento da linha de base, VI5 etanol adoçado com sacarina e – VI 5 sacarose 14,2%. Após o retorno a linha de base, o esquema de reforçamento da sacarose foi mantido em VI5 e o esquema de reforçamento da barra em que estava o etanol adoçado com sacarina foi aumentado, primeiro para 30s e depois para 90s. Em seguida, em outra fase deste experimento, os animais foram expostos a uma situação de concorrência entre sacarose 10% e sacarose 10% com quinina 0,0003% (quantidade que produzia a mesma quantidade de respostas que a produzida pelo etanol 10% adoçado com sacarina 0,25%), seguindo o mesmo aumento do esquema de reforçamento na fase anterior do experimento. O último experimento do trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia do reforçamento da sacarina relativa a sacarose e à água, em um teste de preferência. Foram utilizadas duas concentrações de sacarose, 1,25% e 14,2%, a concentração utilizada da sacarina foi de 0,25%. Os resultados mostraram que, quando a exigência do esquema de reforço aumentou, houve decréscimo de respostas mantidas pela sacarose e pela sacarose com quinina. Entretanto, quando houve aumento da exigência de respostas pelo etanol adoçado com sacarina, nem sempre foi possível observar decréscimo de respostas. Deste trabalho, o autor concluiu que respostas por etanol foram mais resistentes ao aumento do intervalo no esquema. Outra conclusão apresentada é que a eficácia reforçadora da solução de etanol com a sacarina dependeu da presença do etanol. Também foi possível concluir que os animais consomem grandes quantidades de etanol mesmo quando tem acesso a uma solução isocalórica.

O trabalho de Heyman (1997) teve a preocupação de testar animais que apresentaram respostas estáveis pelo etanol. Não necessariamente, estes animais preenchiam os critérios de escalada do consumo (tendência de aumento do consumo mesmo diante da variabilidade), mesmo quando consumiam doses ativas. Além disto, uma desvantagem do procedimento diz respeito à manutenção da solução de etanol 10% adoçada com sacarina 0,25%, o que poderia ter interferido nos dados, levantando a dúvida se os animais de fato defenderam o consumo

de etanol pelos seus efeitos, ou pela sacarina. O objetivo central era apresentar diferenças na escolha e analisar o etanol como um reforçador nas contingências programadas.

Ahmed (2010) apresentou uma proposta diferente, pois, primeiramente preocupou-se em garantir o consumo e a escalada do consumo de cocaína, apesar de também utilizar procedimentos de escolha. Neste sentido, parece bastante adequado avaliar o consumo de etanol diante de outro reforçador e medir a preferência pelo etanol. O procedimento de escolha constitui-se como um bom critério para a dependência, uma vez que é bastante semelhante com os comportamentos humanos, em que os indivíduos, em situação de dependência, apresentam preferência quase exclusiva pela busca e consumo de drogas.

Assim, o procedimento de Ahmed (2010) parece adequado como modelo de dependência pois, como já exposto, grande parte das teorias comportamentais que buscam explicar a dependência química partem do pressuposto de alterações nos processos de escolha, ou na interferência dos princípios de escolha com outras variáveis (sejam fisiológicas ou ontológicas) (Heyman 2009; 2013; Hyman et al., 2006; Bechara, 2006; Volkow e Kalivas, 2005).

Em resumo, a dependência química é um assunto amplo e que tem como definição múltiplas variáveis combinadas. A importância do desenvolvimento de um modelo animal é a de possibilitar a compreensão destas variáveis e de seus diversos arranjos. Como já destacado anteriormente, o modelo comportamental parece ser útil neste sentido porque tem por objetivo demonstrar os meios pelos quais a dependência se desenvolve. Dentro do modelo comportamental, o paradigma operante parece demonstrar com maior fidelidade o comportamento de busca e consumo da substância. O comportamento de preferência pela droga é uma das variáveis que apontam para o estreitamento do repertório comportamental no contexto da dependência química. Assim, parece que há um consenso no sentido de que a dependência é resultado de um estreitamento do repertório comportamental, em que as alternativas reforçadoras concorrentes tem seu valor diminuído diante da possibilidade de escolha da droga.

Procedimentos de Indução aos comportamentos que caracterizam a dependência de álcool em animais

Os procedimentos de indução aos comportamentos que caracterizam a dependência de álcool são as manipulações necessárias para que os animais emitam comportamentos

compatíveis com os comportamentos de dependentes. Cada procedimento fundamenta-se em uma parte da dependência a ser modelada no animal. O que os procedimentos induziriam seriam padrões de comportamento medidos pelos modelos de dependência.

Mello (1973) fez uma revisão cuidadosa sobre os métodos de indução ao alcoolismo em animais, e levantou a questão da relação entre a dependência física e a autoadministração de álcool, uma vez que os determinantes cruciais no desenvolvimento da dependência por álcool eram desconhecidos, e a natureza do processo da dependência parecia, naquela época, uma questão de especulação e suposições. A autora defendeu que apenas o desenvolvimento de um animal dependente de álcool permitiria o estudo da história natural do processo de dependência nos níveis comportamentais, bioquímicos e neuropsicológicos. De acordo com a autora, a pesquisa na área demonstrava que por muitos anos as pesquisas concentraram-se nas técnicas para induzir a preferência por álcool em animais, e estes esforços falharam em função do álcool não ser palatável aos animais. Por outro lado, inúmeros grupos tiveram sucesso em produzir dependência física utilizando diferentes rotas de administração, oral, intragástrica, intravenosa e inalada. A autora relatou dados que mostravam que tanto a administração forçada, quanto a autoadministração, foram efetivas em produzir sinais de abstinência do álcool. Por esse motivo, a produção de preferência por álcool foi substituída pelo de produzir animais que apresentassem dependência física, ou seja, sinais de abstinência. É importante ressaltar que, apesar do método de preferência ser efetivo em medir alcoolismo, ele não pareceu efetivo para induzir o alcoolismo, ou seja, o processo da dependência não se iniciaria com a preferência e sim com a escalada do consumo.

Neste contexto, diferentes procedimentos de indução de alcoolismo foram desenvolvidos. Uma diferença entre eles é a via de administração do álcool, pois esta determina a velocidade com que uma dose efetiva de álcool é atingida e influencia a duração e a estabilidade da ação da droga. Vias comuns atualmente utilizadas são a nasal, oral e intragástrica.

Inalação

Vendruscolo e Roberts (2014) realizaram uma revisão cuidadosa sobre o método de indução ao alcoolismo por meio da exposição ao vapor de álcool. Segundo os autores, em 1996, os primeiros estudos bem sucedidos utilizando este método começaram a ser realizados. Tais estudos relevaram que animais tornaram-se dependentes a partir da indução feita por este método, os animais demonstraram aumento da autoadministração operante de

álcool durante a retirada do mesmo quando comparados com os animais que não foram expostos ao vapor de álcool (Vendruscolo e Roberts, 2014). Vendruscolo e Roberts (2014) descreveram algumas vantagens deste procedimento, a primeira delas é o aumento da concentração de álcool no sangue; a segunda é que a concentração de álcool é gradualmente aumentada, o que permite que os animais desenvolvam tolerância aos efeitos do álcool sem que haja prejuízos à saúde, a terceira é que este método induz aumento do consumo de álcool, consumo compulsivo, além da produção de sintomas físicos e motivacionais do alcoolismo. A desvantagem descrita por Vendruscolo e Roberts (2014) refere-se ao fato de que os humanos não inalam álcool, sendo este um procedimento que não é homólogo ao processo de desenvolvimento da dependência em humanos. Braconi et al (2010) apontaram que, apesar de o procedimento apresentar controle preciso sobre o consumo de álcool (dose, padrão de exposição e consumo e duração), este procedimento tem a desvantagem de exigir instrumentos específicos e dispendiosos financeiramente, exige espaço institucional, além de recurso humano especializado e disponível para realização e manutenção.

Administração Oral

A administração oral é um método bastante comum e é homólogo ao desenvolvimento do alcoolismo em humanos. Um método muito usado em roedores para induzir o consumo oral de grandes quantidades de álcool é o de polidipsia induzida pelo esquema. A polidipsia induzida se caracteriza pela situação em que a apresentação intermitente de comida seca (em esquemas de reforço de intervalo fixo - FI, intervalo variável - VI, tempo fixo - FT ou tempo variável - VT), junto com disponibilidade de água, faz com que os animais consumam água em quantidade equivalente à metade de seu peso, durante um período de poucas horas (Falk, 1961). Falk (1972) alterou o procedimento e a água foi substituída pelo álcool gradualmente, até atingir o consumo de 11 e 15g/kg, concentração sanguínea de 100mg/ml. Comparada à produzida pela inalação de álcool (50g/kg em 100mg/ml), esta quantidade é pequena (Vendruscolo e Roberts, 2014), porém o autor observou que após a exposição por 3 meses, eram observados sintomas de abstinência quando o álcool era retirado, indicando sua potencial utilidade para induzir dependência. A vantagem deste modelo é manter altos níveis de álcool na presença da ingestão adequada de alimentos (Mello, 1973).

Ford (2014) realizou uma revisão sobre as variáveis que impactam o procedimento da polidipsia. O autor afirmou que muitas das variáveis da polidipsia já foram cuidadosamente estudadas, entre esta, o esquema de reforço (FT, VT, FI, VI), nível de privação alimentar,

intervalo inter-pellet, e a magnitude do reforçador oferecido. Entretanto, as variáveis relacionadas ao etanol e a polidipsia requerem cuidado, levando em consideração as variáveis como o sabor e a concentração de etanol. A polidipsia foi considerada um poderoso modelo de consumo excessivo porque pode gerar um estado dependente do etanol e níveis intoxicantes de etanol no sangue a partir do consumo oral voluntário. Segundo o autor, as vantagens do procedimento consistem em gerar estados de dependência de álcool em animais, e níveis frequentes e tóxicos da concentração de álcool no sangue a partir do consumo oral e voluntário da droga. As desvantagens descritas são a necessidade de restrição alimentar o animal e a perda do consumo excessivo de álcool com a retirada do esquema (Ford, 2014).

Os procedimentos de autoadministração (induzidos via inalação ou via oral) descritos previamente neste texto têm também sido utilizados como procedimentos de para indução de dependência. Apesar de Mello (1973) e Braconi et al (2010) terem indicado que esses métodos não são efetivos por problemas de palatibilidade do álcool, existem técnicas utilizadas para diminuir os efeitos aversivos do sabor do álcool, como por exemplo a apresentação do etanol adoçado com sacarina ou sacarose; privação alimentar que faz com que o etanol tenha valor reforçador em função de seu valor calórico; polidipsia; entre outras. Assim, atualmente existem várias pesquisas que usam a autoadministração de álcool como procedimento para a indução de dependência. (Koob, 2000; Schulteis et al., 1996; Samson et al., 1998)

Os procedimentos de autoadministração oral de álcool, demonstram boa validade de face com humanos, pois em ambos os casos existe a escolha entre beber e não beber, podem ser úteis na identificação de tratamentos farmacológicos, apresentam técnica simples e produzem dados replicáveis (Koob, 2000; Ahmed, 2012; Hopf e Lesscher, 2014). A variável dependente é a quantidade de álcool consumida e sua preferência relativa entre água e o total de fluido consumido, nos modelos animais de dependência e escolha.

Wolffgramm e Heyne (1995) realizaram uma revisão sistemática dos estudos de dependência de drogas em ratos que demonstram a escalada do consumo que acontece depois que os animais já apresentam comportamentos de consumo de etanol. Os autores defenderam que o procedimento de autoadministração oral de álcool em situações de livre escolha é simples e eficaz para estudar e produzir os comportamentos de procura da droga. Segundo eles, a autoadministração de drogas afeta circuitos neurológicos envolvidos na busca por

drogas . Os autores explicaram que o maior problema de procedimentos que tem administração forçada de drogas é que eles não induzem o consumo de forma análoga às características clínicas do alcoolismo. Com esse objetivo, os autores propuseram um modelo de longo prazo de autoadministração de álcool por ratos com acesso livre e contínuo à substância. Os autores argumentaram que tal modelo permitiria observar o desenvolvimento 'natural' do consumo de drogas, que se inicia com o consumo controlado até a dependência.

O procedimento básico de Wolffgramm e Heyne (1995) com ratos consistiu em disponibilizar o álcool na caixa viveiro por um período de 42 semanas, ou seja, 9 meses. Depois, a droga foi retirada e oferecida após um período que pode variar de 4 a 9 meses de abstinência. Para os autores, o consumo da droga após longo período de abstinência seria indicativo de dependência. O teste de consumo após a abstinência foi realizado da mesma forma que o consumo inicial. Os autores também realizaram um teste de preferência entre o etanol e soluções concorrentes.. Para tanto, separaram os animais em 3 grupos: A, B e C. No grupo A foi testada a preferência entre água e diferentes concentrações de sacarose (5g/l, 10g/l, 20g/l). No grupo B foi testada a preferência entre água e álcool (5%, 10% e 20%). No grupo C foi testada a preferência entre água e todas continham sacarose na concentração 20g/l; a primeira era composta por etanol 5% (v/v) e sacarose 20g/l; a segunda era composta por etanol 10% (v/v) e sacarose 20g/l e a terceira era composta por etanol 20% (v/v) e sacarose 20g/l. Seis semanas após o início do experimento, os autores mediram o consumo de cada grupo. O grupo A apresentou preferência pela solução de sacarose na concentração de 20g/l (consumo de 98,3% de sacarose do total de fluidos), neste grupo a variabilidade interssujeito era extremamente baixa. O grupo B preferiu água (consumo de 75,4% de água do total de fluidos), neste grupo a variação interssujeito foi maior do que do grupo A. O grupo C preferiu água (consumo de 61% de água adoçada com sacarose do total de fluidos), a variação interssujeito foi semelhante ao grupo B. Assim, os resultados mostraram que, mesmo quando o álcool foi adoçado, os animais ainda demonstraram preferência pela água. Os autores afirmaram que, apesar dos ratos do grupo C terem consumido maior quantidade de álcool que os animais do grupo B, a distribuição da preferência e a variabilidade interssujeito foram semelhantes nos grupos B e C. De acordo com a hipótese do alto valor reforçador da sacarose (grupo A) ser superior ao relativo baixo valor reforçador do álcool (grupo B), era esperado que os animais do grupo C se comportassem como os do grupo A, ou seja, consumissem e preferissem maior quantidade das soluções de etanol adoçadas com 20g/l de

sacarose. Os resultados contraditórios indicaram que os efeitos psicotrópicos do álcool foram mais decisivos para o consumo controlado de álcool pelos animais do que o sabor, pois não houve grande diferença no consumo e na preferência de etanol nas situações em que ele estava puro (solução de etanol em água) – grupo B e quando ele estava adoçado – grupo C. Ou seja, a adição de sacarose 20g/l não alterou o consumo e a preferência de etanol.

Em resumo, o experimento de teste de preferência de Wolffgramm e Heyne (1995) demonstrou que, mesmo diante de uma indução de longo tempo, com consumo voluntário, não foi possível estabelecer maior preferência pelo etanol diante de um concorrente (água ou sacarose). Entretanto, os autores não relataram o consumo das doses de etanol, não sendo possível identificar se houve consumo de doses ativas. O fato interessante do experimento é o consumo do grupo C de etanol adoçado com 20g/l de sacarose que foi semelhante ao grupo B, quando o etanol não estava adoçado. Tal dado pode indicar que, quando o etanol está adoçado, ainda assim, não há aumento significativo de seu valor reforçador e, portanto, que a baixa preferência por etanol não está relacionada apenas à sua palatabilidade.

Método de indução operante

Segundo Mello (1973) o método mais análogo à condição humana é a indução operante, pois permite simular as contingências que controlam a manutenção do consumo de álcool. Os procedimentos de autoadministração operante promovem aprendizagem de contingências reforçadoras - positivas ou negativas (Sanchis-Segura e Spanagel, 2006). Nestes, o esquema de reforçamento mais utilizado é o *fixed ratio* (FR). Apesar do uso de reforço na indução ao consumo, nenhuma via de administração da droga é privilegiada neste procedimento, assim sendo, as vias de administração intravenosa, intraventricular, intracranial, intragástrica ou oral podem ser mantidas pelo comportamento operante. Sanchis-Segura e Spanagel (2006) ressaltam que a eficácia reforçadora não é uma propriedade estável e linear do reforçador, entretanto, esta muda em função de fatores procedimentais (rotas de administração, duração da administração), estados internos do sujeito (restrição alimentar, dependência) e reações dos sujeitos ao ambiente (i.e., estresse). Este dado está de acordo com o fato de que as escolhas são dinâmicas (Heyman, 2009), e que o valor reforçador das alternativas muda em função de muitas variáveis. Desta forma, não existe um único procedimento para indução de alto consumo de drogas, ou da preferência por estas, mas vários, a depender da manipulação e da combinação das variáveis críticas.

Quando os procedimentos operantes são comparados aos não-operantes, observa-se que o uso dos primeiros fornecem maior flexibilidade aos esquemas experimentais e podem ser mais informativos no que tange à distribuição temporal de respostas a serem analisadas. Além disto, os procedimentos operantes são considerados procedimentos válidos e confiáveis de consumo humano de drogas. Assim, a automatização destes métodos reduz a intervenção humana e os resultados apresentam boa replicabilidade (Sanchis-Segura e Spanagel, 2006).

O procedimento de indução a autoadministração operante de álcool é descrita no experimento clássico de Samson (1986). De acordo com o autor, até o momento da sua publicação havia pouco sucesso em manter respostas de autoadministração de etanol sem privação de comida ou de água. A privação não seria um método desejável para induzir dependência, pois a resposta de autoadministração poderia ser mantida em função das calorias do álcool e não em função do seu efeito farmacológico. Como alternativa, propôs um procedimento em que a resposta de pressão a barra era modelada no esquema de CRF e, tinha como consequência a solução de sacarose na concentração de 20% (w/v). Depois da modelagem, o autor realizou sessões no esquema FR4, e a consequência dispensada era a solução de sacarose 20% (w/v). Após a estabilidade, o esquema vigente era FR4, mas a consequência dispensada foi sacarose na concentração 10% (w/v), por duas sessões; em seguida, foram realizadas três sessões em que a consequência era uma solução de sacarose 10% (w/v) com etanol 2% (v/v). Gradativamente, houve aumento da concentração de etanol até atingir 10% e diminuição da concentração de sacarose até atingir 2%. Ao final do estudo, o autor demonstrou que a resposta de pressão a barra era mantida apenas pela solução álcool diluído em água na concentração de 10% (v/v).

O procedimento de Samson (1986), e variações, é largamente utilizado para aumentar o consumo de álcool por meio do condicionamento operante. Entretanto, em alguns estudos realizados no nosso laboratório a retirada de sacarose no processo de *fade out* diminuiu o número de respostas pelo álcool na concentração de 10% (Galesi, 2009 e 2014, Bernardes, 2014), indicando que as altas taxas de respostas por solução de álcool e sacarose eram, majoritariamente, controladas pela sacarose e não pelo álcool.

Simms, Bito-Onon, Chatterjee e Barlett (2010) discutem que apesar da importância do modelo operante proposto por Samson (1986), este sofre de limitações que são relacionadas ao procedimento de *fade in* de álcool e *fade out* de sacarose. Os autores apontaram como limitações a necessidade de sacarose, de privação de água para o início da aquisição das

respostas de procura e consumo, e o baixo volume consumido após a retirada da privação e da sacarose. Nesse procedimento há uma dificuldade clara na manutenção das respostas quando o estímulo reforçador é o álcool sem adição de sacarose. Os autores citaram inúmeros estudos que observaram tais dificuldades, em alguns deles, observou-se que a sacarose pode ser uma substância aditiva para roedores, em outros, constatou-se que a sacarose pode causar ativação cerebral similar e mais reforçadora em roedores do que drogas usadas por humanos, tais como opióides. Assim, o uso de sacarose na indução do consumo de álcool pode resultar em dados confusos sobre a função do álcool como estímulo reforçador em modelos animais de abuso e dependência de álcool.

Para avaliar o papel da sacarose nos procedimentos de indução operante que seguem o delineamento proposto por Samson (1986), Simms, Bito-Onon, Chatterjee e Barlett (2010) submeteram 3 diferentes grupos de ratos a diferentes manipulações de disponibilização de álcool. O consumo do primeiro grupo (Grupo S) foi induzido pelo procedimento de *fading* de sacarose e de etanol. Inicialmente os animais foram expostos a quatro dias de administração forçada na caixa viveiro, em que o único líquido disponível era álcool na concentração de 10%. Após o quarto dia, os animais foram colocados na caixa operante, em esquema de razão fixa - FR1, e o estímulo reforçador era sacarose na concentração de 10%, cada sessão durava 14 horas, durante três dias e o esquema foi alterado até que os animais continuassem respondendo em FR3. Após este período, iniciou-se o procedimento de *fade in* de álcool e *fade out* de sacarose. Após o *fade out* completo de sacarose, os animais permaneceram pelo menos 20 sessões em FR3 e tiveram como estímulo reforçador solução de álcool 10%. Após 25 sessões no esquema de reforço FR3 e consequência solução de etanol 10%, os animais foram colocados em esquema FR3 por 5 sessões e a consequência era etanol 20%.

O segundo grupo (Grupo I) foi submetido a um procedimento de autoadministração intermitente de álcool 20%. Os animais deste grupo foram mantidos com água e comida sempre *ad libitum* durante todo o experimento. Os animais eram colocados na caixa operante, em esquema de reforço FR1 e recebia 0,1ml de álcool na concentração de 20% a cada pressão a barra. Inicialmente, foram realizadas 12 sessões de 14 horas de duração, três vezes por semana, por quatro semanas consecutivas. Depois, foram realizadas 12 sessões com duração de 45 minutos, três vezes por semana, durante duas semanas, em esquema de reforço FR1. Finalmente, foram realizadas sessões de 30 minutos, em esquema de reforço FR3, três vezes por semana por, no mínimo, 20 sessões.

O terceiro grupo (Grupo C) foi submetido a um procedimento de autoadministração diária de álcool 20%. O procedimento foi semelhante ao usado com o segundo grupo, mas as sessões ocorreram todos os dias da semana, desde o início.

Os resultados deste estudo apontaram que, nas sessões que aconteceram durante o ciclo ativo - 14 horas, houve um aumento do consumo de álcool e do número de pressões à barra ativa, para ambos os grupos, C e I. Quando as sessões foram reduzidas para 45 minutos, houve novo aumento do consumo, entretanto, o grupo I mostrou significativamente maior consumo que o grupo C. Durante o mesmo período, o grupo S consumia quantidades semelhantes ao grupo C. O grupo S consumiu durante todas as fases do experimento uma média de $45,63 \pm 2,02$ g/kg. Foram realizadas 20 sessões diárias, em FR3, com duração de 30 minutos, para todos os grupos, o grupo S teve como consequência, etanol 10% (v/v). O grupo I e o C tiveram como consequência etanol 20% (v/v). Nas sessões em FR3, apenas os animais que consumiam mais que 0,3g/kg continuaram no experimento. No grupo S, 90% dos animais continuaram, no grupo C foram 86,7% e no grupo I 75%. Nesta última fase, os animais do grupo I e C não diferiram significativamente na quantidade de álcool consumido. Os autores apontam que as quantidades de álcool consumidas nesta fase (média de 1,5g/kg a 2,7g/kg em 30 minutos), foram uma das maiores quantidades relatadas na literatura de consumo de álcool. Estas taxas foram mantidas tanto para o grupo I quanto para o grupo C de álcool na concentração de 20%. Apesar de haver maior consumo de etanol em g/kg nos grupos I e C, não houve diferenças significativas para a taxa de respostas entre estes grupos e o grupo S. Quando os animais do grupo S foram desafiados a responder por 5 dias em esquema de FR3 a etanol na concentração de 20% (v/v), eles consumiram mais etanol do que quando estavam no esquema FR3 e a consequência era etanol 10% (v/v).

Os dados obtidos por Simms et al (2010) são de especial interesse para a área de pesquisa sobre alcoolismo, pois refutam a hipótese de que ratos não consomem álcool por seu sabor ser aversivo, como apontado por Mello (1973) e outros autores, e indicam que o regime de acesso ao álcool é uma variável chave para produzir o consumo de altas quantidades dessa substância. Além disto, Simms et al (2010) realizaram medida do nível sanguíneo de álcool, esta medida corroborou que os animais tinham ingerido doses ativas.

Augier et al., (2014) consideraram que a autoadministração operante é um importante modelo de motivação para o consumo de álcool. Entretanto, os autores ressaltaram que os estudos na área tem longo tempo de treino até que taxas altas e estáveis de consumo sejam

alcançadas, que é em média 3 semanas. Os autores propuseram um novo procedimento operante para a indução da autoadministração de álcool que não fez uso da privação ou da sacarose para indução do consumo e que teve tempo reduzido de indução ao consumo. Dois grupos de ratos foram submetidos a duas condições de privação de água: 22 h antes da sessão e 0 h antes da sessão (sem privação). A privação aconteceu apenas nos três primeiros dias do experimento. Nos quatro primeiros dias de experimento, os animais de ambos grupos tiveram sessões com duração de 30 minutos, no esquema de reforço FR1, em que o estímulo reforçador foi uma solução de etanol 20% (v/v). Após os quatro dias de sessões, elas ocorreram durante cinco dias por semana, por 13 dias, em FR1; nessas sessões pressões na barra eram seguidas de 0,1ml de álcool na concentração de 20% e de uma luz. Cada pressão era seguida um *timeout* de 5s programado após cada pressão.

Os resultados relatados foram de uma média de $29 \pm 3,0$ pressões à barra ativa pelo grupo privado e $25 \pm 3,8$ pressões pelo grupo não privado. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos em relação às pressões à barra ativa e o número de reforços produzidos. No que tange ao consumo, o grupo privado apresentou uma média de $0,8 \pm 0,09$ g/kg e o grupo não privado apresentou média de $0,76 \pm 0,12$ g/kg. Este estudo contribuiu para demonstrar que não é necessário o uso de privação para indução de consumo de doses ativas de etanol em procedimentos operantes.

Em suma, os estudos descritos acima apontam as vantagens experimentais dos métodos operantes de indução ao alcoolismo. Tais estudos também apontam algumas variáveis relevantes no processo de indução, tais como a importância do regime de acesso ao álcool, bem como, o descarte de variáveis intervenientes que podem produzir dados confusos, tais como a privação alimentar dos animais e os métodos de *fading* com sacarose.

Intubação Gástrica

A intubação gástrica é considerado um método efetivo de indução. A intubação pode ser definida como um método em que o etanol é dispensado no estômago do animal, ela pode ser feita por diversas maneiras e utilizando outras substâncias associadas ao etanol. Este é um método passivo, em que os animais não consomem ativamente a substância.

Braconi et al. (2010) reexaminaram o modelo de intubação intragástrica de álcool como um método de indução aos comportamentos que caracterizam a dependência física. De acordo com os autores, esse método de consumo involuntário é justificado pelo fato de que a literatura relata que ratos não consomem de forma voluntária volumes de álcool suficientes

para produzir dependência, exceto os animais que são geneticamente selecionados. Os autores ressaltaram que o modelo produz dependência em um curto período de tempo, é livre de estresse para o animal, de baixo custo, fácil de implementar, é semelhante aos ciclos de consumo diários em alcóolicos, está associado a baixas taxas de mortalidade e pode ser usado no contexto de estudos comportamentais e neurobiológicos sobre recompensa e motivação da ingestão de álcool.

O método de indução utilizado por Braconi et al. (2010) consistiu de intubações intragástricas de uma solução preparada com álcool, água, leite em pó e sacarose. Foram realizadas quatro intubações por dia, com intervalo de quatro horas entre cada uma delas, durante seis dias. Os autores realizaram medidas de níveis de álcool no sangue, além de medidas de sinais de abstinência (protocolo baseado no estudo de Majchrowicz, 1975) e teste de estresse no labirinto de cruz elevada. Segundo os autores, a administração intragástrica do álcool produziu níveis de intoxicação no sangue que foram significativos. Na análise dos sinais de abstinência, constatou-se que estes aumentaram ao longo dos seis dias. Os sintomas de abstinência foram avaliados segundo uma adaptação da escala de Macey et al. (1996) realizada com base nos sintomas relatados por Majchrowicz (1975). Os comportamentos observados foram: retração do membro ventro-medial; irritabilidade ao toque (vocalização); rigidez da cauda; tremores no corpo. Os autores atribuíram valores de 0 a 2 aos sintomas, 0 = sem sinais; 1 = sinais moderados e 2 = sinais severos. O total das quatro observações geravam um escore que variava entre 0 e 8 pontos (Braconi et al., 2010). Os autores relataram que houve aumento dos sinais de abstinência ao longo dos dias de intubação, no primeiro dia a média de escores foi de $1,9 \pm 0,4$ e no sexto dia foi de $4,5 \pm 0,4$.

Os animais que receberam álcool demonstraram maior nível de ansiedade quando testados no labirinto de cruz elevada, quando comparados aos animais do grupo controle.

Braconi et al. (2010) concluíram que o procedimento é útil e recomendado para a indução de dependência física, pois produz níveis de álcool no sangue elevados e semelhantes aos níveis de indução pelo método de inalação de vapor, um dos mais usados na produção de dependência de álcool. O estabelecimento da dependência, segundo os autores, se daria pela alta taxa de álcool no sangue que é mantida por 10 horas diárias. Ainda os autores apontaram que a principal vantagem da intubação seria o estado de dependência física que podia ser alcançado em um curto período de tempo. Ainda, os autores não registraram mortalidade de animais por intoxicação de álcool, indicando que é um método relativamente

seguro que garante altas taxas de intoxicação por períodos prolongados. Apesar dos autores sinalizarem a importância e a possibilidade de estudos comportamentais a serem realizados a partir deste procedimento, nenhum estudo operante foi realizado até o presente momento.

Objetivo

Os experimentos de Braconi et al., (2010), Wolffgramm e Heyne (1995), Simms et al., (2010) e de Augier et al., (2014) se destacam por produzirem comportamentos caracterizados na dependência de álcool, quando medidos por modelos de escolha ou abstinência. No estudo de Braconi et al (2010) foram obtidos altos níveis de álcool no sangue após administração intragástrica e verificados indicadores de ansiedade por sua retirada; entretanto, não foram realizados testes comportamentais para verificar a autoadministração e preferência por álcool, comportamentos necessários para a definição de dependência. Muitos dos estudos de laboratório que pretendem identificar os mecanismos neurais envolvidos no alcoolismo utilizam a intubação intragástrica como método de indução de dependência, porém, como Braconi et al (2010), carecem de avaliações comportamentais cuidadosas dos padrões de consumo dos animais após a indução. Assim, parece necessário verificar se a administração passiva e crônica de doses altas de álcool produziram padrões comportamentais de consumo semelhantes aos observados em dependentes.

Por outro lado, os experimentos de Simms et al (2010) e Augier et al (2014) são procedimentos de indução por autoadministração. Ambos os procedimentos parecem induzir o consumo de grandes quantidade de soluções com alta concentração de álcool (20%), sem privação de alimento ou de água. Ambos representam um grande avanço na área, pois além de serem procedimentos com maior validade de face que o da administração intragástrica, e modelarem melhor os processos comportamentais observados no desenvolvimento da dependência de álcool, permitem controlar variáveis não diretamente relacionadas com os efeitos farmacológicos do álcool, mas que podem afetar seu consumo, como sabor, fome e sede. Entretanto, nenhum dos dois estudos testou a preferência por álcool e, como já mencionado, o consumo de altas quantidades de álcool é característico do abuso de álcool, mas não é suficiente para definir dependência (Ahmed 2005; 2010. Sachis-Segura e Spanagel 2006). Assim, considerando que a preferência por droga sobre outros reforçadores tem sido proposta como um critério importante para a definição de dependência (Heyman, 1997, 2009, 2013; Ahmed, 2005, 2010; Volkow e Kalivas, 2006), testes de preferência parecem

necessários para avaliar se o padrão de consumo induzido por esses procedimentos se caracteriza pela escolha da droga em detrimento de reforçadores concorrentes.

Considerando o exposto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar e comparar os padrões de autoadministração e preferência por álcool de ratos submetidos aos procedimentos de indução de dependência de Braconi et al.(2010), do grupo intermitente do estudo de Simms et al (2010) e do grupo não privado do estudo de Augier et al. (2014).

Experimento I: Indução à dependência por intubação gástrica seguido de treino operante

O objetivo deste experimento foi avaliar a autoadministração oral de etanol na caixa operante e a preferência por solução de etanol quando concorrente água ou a uma solução de sacarose, depois da administração de etanol por intubação gástrica de acordo com o procedimento proposto por Braconi et. al., (2010).

Método

Sujeitos

Foram utilizados oito ratos (*Rattus Norvergicus*) machos, quatro wistar e quatro ratos espontaneamente hipertensivos (SHR), experimentalmente ingênuos, com 60 dias de idade e pesando entre 250 g e 300 g, no início do experimento. No dia de chegada ao biotério, os ratos foram alocados em quatro duplas, sendo que em cada caixa foram alocados ratos da mesma linhagem, em caixas transparentes de poliuretano transparente (25 x 40 x 20 cm). Estas caixas foram alocadas em estantes ventiladas (Alesco) com isolamento acústico e controle interno de temperatura. Foram mantidos nessa condição de alojamento por 70 dias. Durante esse período os ratos eram manipulados durante 5 minutos por dia. Depois, após o procedimento de intubação intragástrica, foram alojados individualmente em caixas semi-transparentes de poliuretano (38x 16 x 32 cm) e mantidos em estantes ventiladas (Alesco) com isolamento acústico e controle interno de temperatura até o final do experimento.

Durante todo o experimento os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro invertido de 12 horas, com luzes desligadas às 10:00 horas. A ração e água foram disponibilizadas *ad libitum*, com exceção da fase II, em que os animais foram privados de comida durante 14 horas antes das sessões experimentais.

Equipamentos

Foram utilizadas caixas de condicionamento operante (*Med Associates Inc.*) com dimensões 32 cm x 25 cm x 21 cm, com controle por microcomputador IBM-PC ligado a interface e programas *Med-Associates*. As caixas operantes eram separadas por caixas de isolamento acústico e um exaustor para circulação de ar e fornecimento de um ruído branco. Cada caixa é equipada uma barra localizada na parte esquerda da parede direita da caixa, a 8 cm do piso. Sob a barra, a 2 cm do piso, está localizado um bebedouro. Em uma das paredes da caixa (parede direita) haviam duas barras. Cada barra estava localizada a 8 cm do piso. Sob a barra, a 2 cm do piso, estava localizado um bebedouro. Acima de cada barra estava localizada uma lâmpada de 1 W (luz branca), localizada a 15 cm do chão. Uma luz de 2 W localizada na parede esquerda, a 18 cm do chão, permanecia acesa durante toda a sessão experimental (*house light*). Cada caixa tinha um exaustor para circulação de ar e fornecimento de um ruído branco.

O controle e registro de todas as sessões experimentais foram feitos por meio do programa *MED – PC (Med Associates)* e em um computador ligado a interface da caixa.

Drogas e soluções

A solução administrada via intubação intragástrica, foi preparada a partir da diluição de 166 gramas de fórmula para lactente (Nan Pro 2 ® - Nestlé)², 60 gramas de sacarose, 211 ml de álcool 95% em 250 ml de água (Braconi et al., 2010). Após diluição completa, adicionou-se água até que se completasse o volume de um litro.

Durante o treino operante, a solução de etanol usada como consequência da resposta consistiu em diluição de etanol 95% em água, na concentração de 10% (v/v).

Para a gavagem foi utilizada uma sonda uretral nº 04 composta de tubo de PVC atóxico flexível com modelo de furação específica e conector com tampa (CPL Medicals®)

Procedimento

O procedimento foi composto de seis fases. As manipulações realizadas em cada Fase são resumidas na Tabela 1.

² Composição por 100g de pó: carboidratos 58g; proteínas 15g; gorduras totais 21g; gorduras saturadas 8,6g; ácido linoléico 3,3g; ácido α linolênico 380mg; ácido docosaheptaenóico 43mg; ácido araquidônico 43mg; sódio 180mg; cálcio 550mg; ferro 7,5mg; potássio 600mg; cloreto 380mg; fósforo 380mg; magnésio 43mg; iodo 165µg; cobre 400µg; zinco 5,8mg; selênio 9,6µg; manganês 52µg; vitamina A 470µg; vitamina D 11µg; vitamina E 9mg; vitamina K 45µg; vitamina C 80mg; vitamina B1 1mg; vitamina B2 1,3mg; niacina 4,3mg; vitamina B6 0,6mg; ácido fólico 130µg; ácido pantotênico 5,5mg; vitamina B12 1µg; biotina 17µg; colina 65mg; inositol 50mg; nucleotídeos 20mg.

Fase I: Treino de pressão à barra e consumo de etanol na caixa sob esquema concorrente

Todos os animais foram submetidos ao treino de pressão à barra durante onze dias. Os animais foram treinados a pressionar a barra esquerda no esquema CRF e receberam 0,1ml de etanol na concentração de 10% (v/v) como consequência, durante 09 dias. Em seguida, os animais foram treinados em esquema concorrente CRF – CRF, durante dois dias. O objetivo foi modelar a resposta de pressão à em barras concorrentes. A pressão de qualquer uma das barra produzia 0,1 ml de etanol na concentração de 10% (v/v). Cada pressão na barra direita tinha como consequência a iluminação da lâmpada direita e o acionamento do bebedouro direito.. Cada pressão na barra esquerda tinha como consequência a iluminação da lâmpada esquerda e o acionamento do bebedouro esquerdo. Cada acionamento do bebedouro disponibilizava 0,1 ml da solução de etanol na concentração de 10% (v/v). O treino inicial teve duração de cinco dias e as sessões tiveram duração de 1 hora. A *house light* ficou acesa durante todo o experimento

Fase II: Administração de etanol via intubação intragástrica

A administração de etanol por intubação intragástrica foi realizada da mesma forma proposta por Braconi et al. (2010). O começo da administração intragástrica de etanol ocorreu após 60 dias de idade, quando os animais apresentaram peso corporal acima de 250g e dois dias após a Fase I. Cada rato foi intubado por via oral com a sonda uretral (sonda uretral de uso humano, composta por tubo de material maleável e flexível) e 17,8 ml/kg da solução de etanol foi infundida na sonda por meio de uma seringa milimetrada. A solução foi administrada quatro vezes por dia, durante seis dias consecutivos No primeiro dia, os animais receberam 11 g/kg/dia de etanol (17,8 ml/kg de solução), fracionadas em quatro doses (3,0; 3,0; 2,5 e 2,5 g/kg). Entre cada dose houve um intervalo de quatro horas. A partir do segundo dia, foi administrada a dose de 10g/kg/dia, também fracionada em quatro doses: 3,0; 2,5; 2,5 e 2,0 g/kg e cada uma administradas em intervalos de 4 horas.

Fase III: Consumo e Preferência por Etanol sob esquema concorrente CRF-CRF

Após a indução via intubação intragástrica, no dia seguinte, os animais foram novamente expostos à situação operante. O esquema de reforço vigente foi CRF-CRF (CRF ET-CRF SAC). Pressões na barra esquerda disponibilizava 0,1ml de etanol 10% (v/v) e

pressões na barra direita 0,1ml de sacarose isocalórica na concentração de 14,7% (v/v), durante duas sessões, em dois dias consecutivos. Depois, a pressão à barra foi mantida sob o mesmo esquema, mas a consequência associada a cada uma foi a solução de etanol (CRF ET – CRF ET). Todas as sessões dessa fase tiveram duração de 1 h.

Fase IV: Administração de etanol via intubação intragástrica 2 e consumo de etanol na gaiola

Com a finalidade de aumentar o consumo de etanol dos sujeitos na caixa operante, a Fase II foi repetida, entretanto, as intubações foram realizadas durante 3 dias, em dias intercalados. Foram feitas 4 intubações por dia, totalizando 10g/kg. As doses foram fracionadas da seguinte forma: 3,0; 2,5; 2,5 e 2,0; administradas com intervalos de 4 horas. Nos dias subsequentes à intubação foi realizado o consumo voluntário por três dias sob a condição de consumo livre: solução de 10% (v/v) de ET foi disponibilizada no bebedouro, na caixa viveiro, por 12 horas. Esta fase teve duração de seis dias. Tal fase teve por objetivo diminuir a frequência de intubações e aumentar a frequência do consumo voluntário. O sistema misto de consumo voluntário e involuntário foi testado como método de indução.

Fase V: Consumo por etanol em esquema concorrente FR2 –FR2

Inicialmente, foi realizado o mesmo treino operante da fase III, ou seja, o responder por etanol foi mantido sob esquema CRF-CRF (CRF ET – CRF ET); tal procedimento durou treze dias, o critério para o encerramento desta fase foi a estabilidade do consumo. Depois, com o objetivo de aumentar o número de respostas por etanol, introduziu-se um esquema concorrente de reforço FR2-FR2 em ambas as barras, usando a solução ET como consequência da pressão de qualquer uma das duas barras (FR2 ET-FR2 ET). Este procedimento teve duração de 21 dias.

Fase VI: Consumo e preferência por etanol em esquema concorrente FR2 –FR2

Após a fase V, a consequência de uma das alternativas foi substituída para a solução de Sacarose, de forma que pressões em uma das barras tinha como consequência a apresentação de ET, e pressões na outra a apresentação de SAC. Os lados das consequências foram alternados buscando evitar o viés de lateralidade, a alternância foi aleatória, mas cada consequência ficou o mesmo número de vezes em cada lado.

Tabela 1 - Resumo das fases e procedimentos do experimento 1.

Esquema	Consequência	Nº. de sessões	Fase
CRF Continua	Etanol 10% (v/v)	9 sessões	Fase I
Esquema	Consequência	Nº. de sessões	Fase
CRF	Etanol 10% (v/v)	2 sessões	Fase I
1ª Intubação	-	6 (dias)	Fase II
Concorrente CRF	Etanol 10% (v/v) e Sacarose 14,7% (w/v)	2 sessões	Fase III
Concorrente CRF	Etanol 10% (v/v)	9 sessões	Fase III
2ª Intubação + Consumo Voluntário	-	3 (dias) + 3 (dias)	Fase IV
Concorrente CRF	Etanol 10% (v/v)	20 sessões	Fase V
Concorrente FR2	Etanol 10% (v/v)	20 sessões	
Concorrente FR2	Etanol 10% (v/v) e Sacarose 14,7% (w/v)	4 sessões	Fase VI

Análise de dados

As variáveis dependentes analisadas foram taxa de respostas por etanol, preferência por etanol e consumo de etanol. O consumo foi calculado em g/kg. A preferência no esquema concorrente foi calculada como a proporção entre o número de respostas por álcool e o número de resposta total. A taxa foi calculada por frequência de respostas dividida pelo tempo de duração da sessão. O efeito das fases sobre a taxa e preferência foi analisado por meio de uma ANOVA não paramétrica de dois fatores (fase x linhagem) (Rosa, 2001).

Resultados

Consumo em g/kg por fase

A Figura 1 mostra o *box* (mediana, P25 e P75) & *whiskers* (P10 e P90) do consumo de etanol 10% (v/v) ao longo das fases III, V e VI. Observa-se que há diminuição do

consumo ao longo do experimento. Nas fases III (mediana = 1,75g/kg) e V (mediana = 0,89g/kg) houve consumo de doses ativas. Na fase VI, houve queda acentuada do consumo, sendo que a mediana foi de 0,13g/kg.

Figura 1 - Box (mediana, P25 e P75) & *whiskers* (P10 e P90) do consumo de etanol 10% (v/v) ao longo das fases III, V e VI. (CRF ET10% x CRF Sac14,7% - fase III); (CRF ET10% x ET 10% - fase V) e (FR2 ET10% x Sac14,7% - fase VI).

Análise do efeito relativo das Fases III e VI sobre a taxa de respostas por Etanol e Sacarose

A Figura 2 mostra o box (mediana, P25 e P75) & *whiskers* (P10 e P90) das Fases III e VI sobre às taxas de respostas pelo etanol e pela sacarose sob os esquemas concorrentes de cada fase (CRF ET10% x CRF Sac14,7% - fase III) e (FR2 ET10% x Sac14,7% - fase VI). Os resultados são separados pelas cepas SHR e Wistar. Observa-se, na Tabela 2, que a cepa wistar (efeito relativo = 0,228 – fase III e 0,348 – fase VI) apresentou maiores taxas de resposta pelo etanol do que a cepa SHR (efeito relativo de 0,143 – fase III e 0,268 – fase IV), em ambas as fases. Porém, quando a cepa SHR (efeito relativo de 0,696 – fase III e 0,935 – fase VI) apresentou maiores taxas de resposta para sacarose do que a wistar (efeito relativo de 0,643 – fase III e 0,750 – fase VI). Entretanto, não houve diferenças significativas em relação à taxa de respostas entre-cepas (QA = 0,178; gl = 1; e p = 0,67), nem interação (QA =

1,32; $gl = 2,170$; $p = 0,27$), indicando que a taxa de respostas das cepas foi semelhante ao longo das fases. A figura também mostra que a taxa por ET (mediana = 0,23 – fase III e 0,28 – fase VI) foi menor do que a taxa por SAC (Mediana = 2,09 – fase III e 4,67 – fase VI), e a análise estatística indicou que essa diferença foi significativa

($Q_{Aintra} = 30,398$; $gl = 2,170$; $p = 0,00$)

Figura 2 - Box (mediana, P25 e P75) & whiskers (P10 e P90) das Fases III e VI sobre às taxas de respostas pelo etanol e pela sacarose sob os esquemas concorrentes de cada fase (CRF ET10% x CRF Sac14,7% - fase III) e (FR2 ET10% x Sac14,7% - fase VI).

Tabela 2 – Efeito relativo estimado da taxa de respostas por etanol e por sacarose, nas fases III e VI.

Cepas	Fase III - ET	Fase VI - ET	III - SAC	VI - SAC
SHR	0,143	0,268	0,696	0,935
Wistar	0,228	0,348	0,643	0,750

Análise do efeito relativo das Fases III e VI sobre preferência pelo etanol

A Figura 3 mostra o box (mediana, P25 e P75) & *whiskers* (P10 e P90) das Fases III e VI da preferência por Etanol de ambas as CEPAS nas Fases III e VI. A tabela 03 mostra os efeitos relativos estimados para a preferência por etanol nas fases III e IV. A análise estatística indicou que houve maior preferência por etanol na cepa wistar do que na cepa SHR (QAentre = 3,751; gl = 1; p = 0,05), em ambas as fases (QAint = 0,612; gl = 1,406; p = 0,43). Ainda, indicou diminuição da preferência quando compara-se o primeiro dia de teste com o segundo dia nas Fases III e VI (QA = 8,765; gl = 1,406 p = 0,00).

Figura 3 - Box (mediana, P25 e P75) & *whiskers* (P10 e P90) das Fases III e VI da preferência por Etanol de ambas as CEPAS nas Fases III e VI.

Tabela 3 – Efeitos relativos estimados para a preferência por etanol nas fases III (1 e 2) e VI (1 e 2), em dois dias de teste para as duas fases.

Cepas	III - 1	III - 2	VI - 1	VI - 2
SHR	0,542	0,399	0,458	0,077
Wistar	0,830	0,464	0,741	0,357

Discussão

O Experimento I teve por objetivo testar o consumo e a preferência em um procedimento operante após a indução à dependência química via intubação intragástrica. O protocolo de intubação utilizado foi baseado no estudo de Braconi et al (2010). Nesse estudo, os autores não realizaram testes de consumo operante ou preferência, a dependência foi

avaliada apenas em função dos sinais físicos de abstinência que os animais apresentaram após a retirada de etanol, e em função dos níveis sanguíneos de etanol. Neste experimento, a medida de etanol no sangue não foi coletada em função dificuldades técnicas e de material.

Braconi et al (2010) correlacionaram as medidas físicas com medidas comportamentais de ansiedade no labirinto de cruz elevada. Observaram que os animais que passaram pelo protocolo de intubação com etanol passavam menos tempo nos braços fechados do que os animais que passaram pelo mesmo protocolo, mas com água. Este teste não foi realizado no presente estudo porque fugia dos objetivos deste, porém, como dado anedótico, observamos irritabilidade e agressividade nos animais que apresentaram sinais de abstinência (agitação motora acentuada e vocalizações quando manipulados)³. Braconi et al., (2010) consideraram vocalizações provocadas pela manipulação dos animais como um comportamento da escala de abstinência medida por eles.

Braconi et al (2010) relataram queda de peso (em média 5,3g) durante os seis dias de intubação intragástrica. Neste trabalho, o efeito da intubação sobre o peso foi medido durante a Fase II (primeiro protocolo de intubação) do mesmo modo que os autores fizeram. Os animais da linhagem wistar deste experimento também diminuíram de peso durante os dias da intubação, porém muito mais do que Braconi et al (2010), pois a perda foi, em média, 30g. Uma possível explicação poderia ser que a fórmula do leite lactente usada por esses autores para fazer a solução de etanol, ou a composição da ração fornecida para os animais para alimentação, foi diferente a utilizada neste trabalho (por exemplo, continha mais carboidratos ou gorduras), porém não há informações disponíveis sobre a ração utilizada naquele trabalho. Outra possibilidade seria as condições de alojamento dos animais, pois no estudo original os animais foram alojados isoladamente e neste estudo os animais estavam alojados em pares.

Por outro lado, os animais da linhagem SHR aumentaram de peso durante a intubação, em média 15g, diferente do observado com a linhagem wistar neste estudo, e em Braconi et al (2010). Os animais da linhagem SHR são hipertensivos e há estudos mostrando que eles apresentam maior consumo voluntário de etanol quando comparados com outras linhagens. (Yoshimoto et al., 2003; DaSilva, Ramos e Takahashi, 2004; DaSilva, Vendruscolo, & Takahashi, 2005). Uma hipótese que poderia explicar o ganho de peso seria o efeito ansiolítico e

³ Durante a fase II foram realizados registros do comportamento dos animais para avaliar sintomas físicos de abstinência. em campo aberto. As observações foram realizadas 8 horas após a última intubação gástrica do dia, durante 05 dias, Detalhes desses registros podem ser encontrados no APÊNDICE 1.

hipotensivo do etanol (Da Silva, Vendruscolo e Takahashi, 2005), tal efeito poderia ter influência no padrão alimentar dos animais, fazendo com que, diante do consumo de etanol, eles aumentassem o peso. Neste sentido, os animais da cepa SHR podem ter apresentado uma diminuição do estresse (ocasionado pela intubação) maior do que os da cepa wistar.

Em relação aos efeitos do protocolo de intubação de etanol sobre a posterior autoadministração, observamos no presente trabalho que foi possível manter os sujeitos respondendo por etanol 10% (v/v) em doses orais que são consideradas “ativas”, isto é, com efeito relevante sobre o sistema nervoso central (Williams-Hemby e Porrino, 1997), ao longo do experimento (Fases II, V e VI). Portanto, o protocolo pode ser considerado adequado para estabelecer o Etanol como estímulo reforçador (Sanchis-Segura e Spanagel, 2006). Entretanto, foi observada variabilidade intra-individual, e entre os animais de uma mesma linhagem, indicando que o efeito não foi robusto. Por exemplo, na Fase III, particularmente, quando a solução de etanol 10% (v/v) esteve concorrente com a solução de sacarose 14,7% (w/v) três animais consumiram doses aquém da dose ativa em várias ocasiões (dados não mostrados).

O fato de animais que consumiram doses importantes de etanol (muito acima da dose “ativa”) não terem preferido etanol quando esteve concorrente com sacarose, levantou a hipótese de que a administração passiva de etanol pelo procedimento de intubação intragástrica, sem que houvesse exposição voluntária prévia, pudesse ter afetado a preferência. Por esse motivo foi elaborado um procedimento (fase IV) que combinou a intubação, que é de administração passiva, com a autoadministração na gaiola (consumo voluntário). Nesta fase, todos os animais consumiram doses ativas, entretanto, o consumo médio na Fase V foi menor do que o da Fase III. Além disto, a variabilidade intra-sujeitos permaneceu alta, indicando que as mudanças realizadas no protocolo não alteraram o consumo de ET da forma esperada (alto consumo e baixa variabilidade).

Na Fase V foi aumentado o esquema de reforço para FR2, para observar se haveria manutenção da dose de etanol ingerida após o aumento na exigência da resposta. Na fase VI este esquema foi mantido. Os resultados indicaram que os animais defenderam o consumo e mantiveram a ingestão de doses ativas, porém novamente observou-se alta variabilidade intra-sujeito. O estudo de Heyman, Gendel e Goodman (1999) também observou manutenção da taxa por etanol com aumentos da razão. Os autores testaram o efeito do aumento da razão sobre respostas mantidas por etanol 10% adoçado por sacarina, quando

essa droga era disponibilizada de forma concorrente com uma solução isocalórica sob um esquema concorrente de razão variável (VR - VR). Inicialmente, os animais respondiam em VR5 em ambas as alternativas; depois, o esquema foi aumentado para VR7,5, VR10, VR15, VR30 em uma das alternativas; por último, voltou a VR5. Os resultados demonstraram que os animais defenderam mais o consumo de etanol do que o consumo da substância isocalórica. Os autores discutiram que, neste experimento, a demanda pelo álcool foi inelástica, ou seja, não variou conforme o aumento do custo de resposta. Eles atribuíram a demanda inelástica por álcool aos seus efeitos farmacológicos. Ainda que nossos dados pareçam de acordo com os de Heyman (1999), é importante destacar que o FR2 é uma razão baixa quando comparada com os valores de razão utilizados pelo Heyman (1999) e, portanto, é necessária a avaliação de maiores valores de razão para avaliar a elasticidade ou inelasticidade do consumo de etanol após o procedimento de intubação intragástrica aqui realizado.

Em relação à variabilidade individual no consumo encontrada nas fases de autoadministração operante (Fases III, V e VI), não foi possível identificar uma variável experimental que a tenha produzido, porém, dados obtidos no nosso laboratório com ratos não privados (Galesi, 2009 e 2014), assim como dados obtidos em laboratório com macacos rhesus e humanos, mostram que o padrão de autoadministração de álcool sob esquemas de reforço é irregular, com sessões caracterizadas pelo alto consumo seguidas de sessões de baixo consumo (Griffiths, Bigelow e Henningfield, 1980). De acordo com Mckim e Hancock (2012), o padrão de alcoólatras em ambiente natural seria similar ao observado dentro do laboratório.

Por último deve ser mencionado que ao longo do tempo, e das fases, os animais diminuíram o consumo de álcool. Na Fase III, os sujeitos consumiram em média entre 0,8 e 5g/kg, na Fase V, consumiram entre 0,8 e 1,4 g/kg, e, na fase VI, os animais consumiram, em média, 0,20 e 0,69 g/kg de etanol. Isso parece indicar que o efeito do consumo operante induzido pela intubação intragástrica não seja permanente. Levanta-se ainda a hipótese de que na Fase V o consumo tenha diminuído porque o protocolo de indução da Fase IV foi realizado pela metade. Possivelmente, a menor exposição aos efeitos da intoxicação severa do etanol e, conseqüentemente, a diminuição dos efeitos da retirada do álcool na Fase V, tenham sido fatores que prejudicaram o consumo nessa fase.

Em resumo, o protocolo de indução por pré-exposição ao álcool por intubação intragástrica de Braconi et al (2010) foi eficiente para estabelecer o etanol como reforçador e manter a média de consumo de doses ativas; entretanto, o protocolo não garantiu estabilidade diária do consumo, mas produziu o padrão característico de autoadministração observado em outras pesquisas.

Em relação ao efeito do protocolo de Braconi et al (2010) sobre a preferência por etanol, os dados deste experimento foram claros em mostrar que a ingestão por intubação intragástrica não produziu dados diferentes aos mostrados pela literatura com ratos não dependentes; isto é, os ratos preferiram a solução de sacarose e escolheram em menos de 30% a solução com etanol (Bernardes, 2014; Heyman, 1996 e 1999).

Experimento II: Indução à dependência com procedimento operante seguido de teste de preferência

O experimento teve como objetivo avaliar a autoadministração oral de etanol na caixa operante e a preferência por solução de etanol quando concorrente com água e com uma solução de sacarina, depois dos ratos passarem pelo procedimento de administração de etanol de Simms et al., (2010; grupo intermitente).

Método

Sujeitos

Foram utilizados oito ratos wistar machos, experimentalmente ingênuos, pesando em média entre 150 e 175 gramas no início do experimento. Foram mantidos em ciclo regular, em que a fase de claro iniciava-se às 8:00 da manhã e a fase de escuro começava às 20:00. Os sujeitos eram alojados individualmente em caixas semi-transparentes de poliuretano de dimensões 38 cm x 16 cm x 32 cm, alocados em *hacks* ventilados (Mod. ALE, MIL. 01.05). Os *hacks* ventilados estão alojados no biotério do Departamento de Psicologia Experimental da Universidade de São Paulo. O biotério dispõe de controle de ciclo - claro/escuro (liga as 8 e desliga as 20 horas), bem como de temperatura ($21\pm 2^\circ$). Foram manipulados durante 5 minutos por dia e mantidos com ração e água *ad libitum*, durante todo experimento.

Droga

Álcool etílico absoluto (labsynth 99,5%) dissolvido em água na concentração de 20% (v/v) em água corrente.

Equipamentos

Caixas operantes como descritas no Experimento 1, porém a barra direita foi removida durante as Fases I, II e III e foi colocada durante as Fases IV e V.

Procedimento

O experimento foi realizado em 6 fases, descritas com detalhe a seguir e resumidas na Tabela 4.

Fase I: Treino de respostas por etanol na caixa operante: sessões de 14 horas

Após os animais atingirem o peso mínimo de 150g, foram submetidos a sessões operantes com duração de 14 h. Na primeira sessão, foram colocados na caixa operante às 17:00 horas até as 7:00 horas. Nesta sessão apenas a barra esquerda ficou disponível. A modelagem de pressão foi realizada pela exposição ao esquema CRF⁴. Cada pressão na barra esquerda iluminavam a lâmpada esquerda e disponibilizava 0,1ml da solução de etanol no bebedouro esquerdo. As sessões foram realizadas três vezes por semana (segunda, quarta e sexta) por quatro semanas consecutivas, totalizando 17 sessões. Nesta fase, os sujeitos continuaram recebendo água e comida *ad libitum* em suas gaiolas viveiro.

Fase II: Treino de respostas por etanol na caixa operante: sessões de 45 minutos

O procedimento foi semelhante ao da Fase I, com a única diferença das sessões durarem 45 min. As sessões ocorreram três vezes por semana (segunda, quarta e sexta). Esta condição foi mantida por duas semanas consecutivas, ou seja, foram realizadas 6 sessões.

Fase III e IV: Linha de base : sessões de 30 minutos

Nesta fase, os animais foram submetidos a sessões no esquema FR3 (a cada 3 pressões na barra esquerda era liberada a solução de etanol) por 28 sessões. Cada sessão durava 30 minutos, e eram realizadas três sessões por semana (segunda, quarta e sexta). Na fase IV, as sessões passaram a ser diárias, em FR3 e reforçador etanol 20% (v/v), e esquema FR3 ET20% na barra esquerda. Essa condição ficou em vigor por dezesseis sessões.

Fase V: teste de preferência ET 20% x Água

⁴ Os animais não passaram por procedimento de modelagem do comportamento de pressão à barra antes de serem expostos a esta fase. A aquisição do comportamento de pressão à barra aconteceu durante as sessões desta fase

A pressão à barra foi medida sob um esquema concorrente FR3 – FR3 (FR3 ET - FR3 AG). Pressões em uma das barras tinham como consequência água e pressões na outra barra tinha como consequência a solução de etanol. Foram realizadas seis sessões nesta fase. Em três delas, pressões na barra da direita eram seguidas de água e pressões na barra da esquerda de etanol, sendo em outras três o inverso. A ordem dessas sessões foi aleatória. As sessões foram realizadas diariamente e tinham duração de 30 min.

Fase VI: teste de preferência ET 20% x Sacarina 0,25%

O procedimento foi semelhante ao da Fase IV, porém, como reforçadores concorrentes foram utilizados a solução de etanol e uma solução de sacarina dissolvida em água corrente na concentração de 0,25%.

Tabela 4 - Resumo de todas as fases e procedimentos do experimento 2.

Esquema	Consequência	Nº. de sessões	Duração	Fase
CRF	Etanol 20% (v/v)	17 sessões	14 horas	Fase I
CRF	Etanol 20% (v/v)	06 sessões	45 minutos	Fase II
FR3 – 3x na semana	Etanol 20% (v/v)	28 sessões	30 minutos	Fase III
FR3 - diário	Etanol 20% (v/v)	16 sessões	30 minutos	Fase IV
Concorrente FR3	Etanol 20% (v/v) e água	06 sessões	30 minutos	Fase V
Concorrente FR3	Etanol 20% (v/v) e Sacarina 0,25% (w/v)	06 sessões	30 minutos	Fase VI

Análise de dados

Foram analisadas as variáveis taxa de consumo, taxa de resposta nas fases V e VI e preferência por etanol por ANOVAs não paramétricas de medidas repetidas (Rosa, 2001). O consumo e a frequência de respostas foram transformados em taxas (g/kg/min e No. de respostas /min, respectivamente) com o objetivo de relativizar o viés de tempo, uma vez que as fases apresentaram diferentes durações.

Resultados

Consumo

A Figura 4 A mostra a mediana do consumo de etanol em g/kg/min ao longo das fases. Observa-se aumento do consumo nas fases II, III e IV. Os animais aumentaram o consumo quando o tempo de sessão passou de 14 horas para 45 minutos (Fases I e II, respectivamente), e o mantiveram nas Fase III e IV, quando o esquema de reforço em vigor aumentou a FR3. Entretanto, diminuíram expressivamente o consumo quando água (Fase V) ou sacarose (Fase VI) foram concorrentes ao etanol. Outro dado de se notar nesse figura é que a variabilidade aumentou bastante das fases II à IV, mas quando o etanol esteve concorrente com a água ou com a sacarina (Fases V e VI), os animais responderam de forma mais uniforme.

A Figura 4 B demonstra a mediana do consumo absoluto em cada fase, os dados indicam que a maioria dos animais consumiu doses ativas de etanol ao longo das fases.

Figura 4 - Box (mediana, P25 e P75) & *whiskers* (P10 e P90) do consumo de etanol (absoluto A e relativo B) 20% (v/v) ao longo das Fases I, II, III, IV, V e VI. Na Fase I (CRF ET20% - 14 horas), Fase II (CRF ET20% - 45 min.), Fase III (FR3 ET 20% - 30 min.), Fase IV (FR3 ET 20% - 30 min., diário), Fase V (FR3 ET 20% x FR3 água, 30 min., diário) e VI (FR3 ET 20% x FR3 Sac 0,25%, 30 min., diário).

A Tabela 5 mostra os efeitos relativos de cada fase sobre o consumo, de acordo com a ANOVA não-paramétrica. Nota-se que há um aumento do efeito da Fase I de 0,484 para a Fase II, que foi de 0,680. Entretanto, há queda do efeito relativo quando o esquema de reforço

é alterado para FR3 ($ER = 0,539$). Na Fase IV, quando as sessões são diárias, no esquema FR3, há uma pequena queda no efeito relativo, que é de 0,508. Observa-se maior queda do efeito relativo nas fases V e VI, em que este é de 0,375 e 0,414, respectivamente. Portanto, de acordo com os efeitos relativos, os ratos tenderam a consumir mais etanol na Fase II do que nas outras fases, entretanto, essa tendência não foi estatisticamente significativa ($QA = 2,486$; $gl = 2,026$; $p = 0,0833$).

Tabela 5 - Efeito relativo estimado do consumo de etanol (g/kg/min) durante as fases do experimento 02.

I	II	III	IV	V	VI
0,484	0,680	0,539	0,508	0,375	0,414

Taxa

A Figura 5 mostra os resultados da taxa de respostas nas fases V e VI. As taxas de respostas foram para etanol, água, na fase V e etanol e sacarina, na fase VI. É possível observar que da fase V à VI houve aumento da taxa de respostas tanto para o etanol, quanto para a sacarina; porém a Tabela 6 indica que os efeitos relativos de todos os tratamentos ficaram perto de 0,5 (i.e. do acaso) e, portanto, o aumento descrito na Figura 6 não foi estatisticamente significativo ($QA = 1,850$; $gl = 2,080$; $p = 0,1573$).

Figura 5 - Box (mediana, P25 e P75) & *whiskers* (P10 e P90) da taxa de respostas (respostas/minuto) nas fases V (FR3 ET 20% x FR3 água) e VI (FR3 ET 20% x FR3 Sac 0,25%), pelo etanol e pelos concorrentes, água e sacarina.

Tabela 6 – Efeitos relativos de tratamento da taxa de respostas durante as fases V e VI para etanol e para os concorrentes água e sacarina

V - ET	VI - ET	V – Água	VI - SAC
0,430	0,508	0,469	0,594

Preferência

Na Figura 6 podem ser observados os diagramas *box & whyskers* dos resultados da preferência por etanol, nas Fases V (concorrente à água) e VI (concorrente à sacarina). Nota-se que, independentemente do concorrente, os animais distribuíram por igual as respostas entre o etanol e seu concorrente, indicando que não houve preferência por algum dos reforçadores. Esse resultado foi confirmado pela análise estatística ($QA = 0,137$; $gl = 1$; $p = 0,7110$), que revelou que os efeitos relativos da preferência por etanol foram semelhantes com ambos os concorrentes (0,477 com a água - Fase III e 0,523 com a sacarina - Fase VI).

Figura 6 - Diagramas *box & whyskers* dos resultados da preferência por etanol, nas fases V(FR3 ET 20% x FR3 água) e VI (FR3 ET 20% x FR3 Sac 0,25%).

Discussão

O objetivo do presente estudo foi replicar o estudo de Simms et al. (2010) e realizar teste de preferência entre solução de etanol 20% (v/v) e água e depois entre solução de etanol 20% (v/v) e solução de sacarina 0,25% (w/v). Os resultados da Fase I deste trabalho são semelhantes aos relatados por Simms et al. (2010): os sujeitos deste estudo consumiram entre 0,05 e 9,87 g/kg durante as sessões intermitentes de 14 horas (Fase I), no estudo de Simms et al. (2010) os sujeitos consumiram entre 2 e 9 g/kg durante 14 horas.

Os resultados da Fase II (sessões com duração de 45 minutos) foram diferentes dos encontrados por Simms et al (2010), pois no presente estudo os animais consumiram em média entre 0,02 e 1,39g/kg e naquele estudo os ratos consumiram em média entre 2,03 e 2,29g/kg. No experimento de Simms et al. (2010), os animais consumiram na Fase II, em 45 minutos de sessão, a menor quantidade consumida na Fase I (14 horas de sessão), ou seja, 2g/kg. Neste experimento os animais também apresentaram o mesmo padrão. Entretanto, o consumo da Fase I foi menor do que o consumo relatado por Simms et al. (2010). Por último, nas fase III e IV (durante as sessões com duração de 30 minutos, em esquema FR3), os

animais do presente estudo consumiram entre 0,01 e 1,5g/kg, em Simms et al (2010) o consumo variou entre 0,7 e 1,8g/kg.

Tomados em conjunto, os resultados indicam que, diferente de Simms et al (2010), neste experimento houve animais que não ingeriram doses ativas de etanol em todas as fases. Esse resultado poderia ser explicado pelas linhagens usadas em cada experimento: Long-Evans e Wistar, respectivamente. Khanna, Kalant, Shah e Sharma (1990) compararam o consumo de etanol de quatro linhagens de ratos, Long-Evans, Wistar, Fisher 344 e Sprague-Dawley. Os resultados demonstraram que a cepa Long-Evans foi a que apresentou maior média de consumo de etanol voluntário na caixa viveiro.

A partir da Fase II, a taxa de consumo de etanol diminuiu ao longo das fases, sendo que a maior diminuição aconteceu nas fases V e VI quando o etanol esteve concorrente com água e com sacarina. Diminuição do consumo de um reforçador após a disponibilização de um concorrente é um fenômeno bem documentado. Na economia comportamental esse efeito é denominado de substituição (Heyman, 2000). Pesquisas com drogas parecem indicar que o fenômeno se estende a drogas (Carrol, 1993).

A substituição não é um fenômeno “tudo ou nada”. Ela é um fenômeno inferido da relação entre reforçadores concorrentes e quantificada em termos da preferência por um reforçador em relação ao seu(s) concorrente(s). Neste experimento observamos que, a despeito da diminuição da taxa de respostas por etanol, não houve preferência pelos concorrentes. Esse dado é diferente do obtido no Experimento 1 deste trabalho e em outras pesquisas (Bernardes, 2014; Heyman, 1996 e 1999; Lenoir et al., 2007), e sugere que o protocolo de indução do Simms et al (2010) alterou o efeito dos concorrentes sobre o consumo de etanol. No Experimento 1, o efeito da introdução da sacarose foi a diminuição substancial do consumo e da taxa por etanol, e alocação significativa das respostas na alternativa por sacarose. Neste experimento foi também observada diminuição do consumo depois da introdução da água e da sacarina, porém, não foi acompanhado da preferência por algum desses concorrentes, indicando que houve apenas substituição parcial desses pelo etanol.

Um resultado que merece atenção é que o efeito de ambos os concorrentes, água e sacarina, terem tido efeitos similares sobre o consumo e taxa por etanol. Estudos prévios, com animais não privados – como neste experimento, tem relatado que a sacarina é um poderoso reforçador (Lenoir et al., 2007). Por outro lado, não é esperado que a água

mantenha respostas operantes em organismos não privados de líquidos, ao menos que manipulações específicas sejam realizadas para isso (Santarém e Silva, 1999); aliás, como neste estudo, a água é frequentemente utilizada como consequência controle em pesquisas em que o etanol é administrado oralmente (Galesi, 2015). Uma possível explicação para os nossos resultados é que o procedimento do Simms et al (2010) tenha reduzido o valor reforçador da sacarina. Isso seria coerente com a proposta de Heyman (2009; 2013) de que na dependência há diminuição do valor reforçador dos concorrentes, e ainda explicaria as baixas taxas produzidas pela sacarina.

A análise individual dos dados revelou que dos 8 ratos, apenas um sujeito preencheu os critérios de escalada de consumo, consumo de doses ativas de etanol e preferência por etanol diante de concorrentes. Sussman, Lisha e Griffiths (2011) afirmam que a prevalência de transtornos de dependência (cigarro, álcool, drogas ilícitas, sexo, jogo, trabalho, exercícios) na população é, em geral, em torno do 10%, valor que aumenta a 15% quando apenas a dependência de álcool é considerada. Essa proporção é similar à encontrada neste estudo (12%) e atesta pela validade da amostragem. Ainda, confirma a proposta de Heyman (1996) que a mera exposição e consumo do álcool não é condição suficiente para o desenvolvimento da dependência química.

Em resumo, o procedimento de Simms et al (2010) parece ter afetado a preferência por soluções adoçadas por sacarina concorrentes com etanol, porém, não produziu na maioria dos ratos padrões de consumo ou preferência que possam ser considerados como dependentes.

Experimento III: Indução à dependência com procedimento operante breve seguido de teste de preferência

O experimento teve como objetivo avaliar a autoadministração oral de etanol na caixa operante e a preferência por solução de etanol quando concorrente a água e a uma solução de sacarina depois dos ratos passarem pelo procedimento de administração de etanol de Augier et al., (2014; experimento 1 - grupo não privado).

Método

Sujeitos

Foram utilizados oito ratos Wistar machos, experimentalmente ingênuos, pesando em média entre 300 e 500 gramas no início do experimento. Os sujeitos eram alojados em dupla em caixas semi-transparentes de poliuretano de dimensões 38 cm x 16 cm x 32 cm, alocados em *racks* ventilados (Mod. ALE, MIL. 01.05). Os *racks* ventilados estão alocados no biotério do Departamento de Psicologia Experimental da Universidade de São Paulo. O biotério dispõe de controle de ciclo - claro/escuro (liga as 8 e desliga as 20 horas), bem como de temperatura ($21\pm 2^\circ$). Assim como no experimento 1, o ciclo foi invertido, as luzes ligavam as 17:00 e desligavam às 05:00. Os ratos foram manipulados durante 5 minutos por dia antes do experimento e mantidos com ração e água *ad libitum*, durante todo experimento.

Droga

Igual ao Experimento 1

Equipamentos

Caixas operantes como descritas no Experimento 1. A barra direita foi inserida nas Fases III e V.

Procedimento

O experimento foi realizado em 5 fases, resumidas na Tabela 7 e descritas as seguir.

Fase I: Modelagem pressão à barra com etanol 20% (v/v).

Do dia 1 ao 4, os animais foram colocados na caixa operante e a pressão à barra foi treinada por um esquema de CRF: cada pressão na barra esquerda era seguida de 0,1ml de etanol na concentração de 20% (v/v). As sessões tiveram duração de 30 min e ocorriam diariamente, cinco dias por semana, (segunda à sexta-feira).

Fase II: Linha de base

Do dia 5 até o 19 (15 dias no total), pressões na barra esquerda sob CRF tinham como consequência a apresentação de um estímulo luminoso (a lâmpada acima da barra era iluminada) e a apresentação de 0,1ml de solução de etanol 20% (v/v). Após a liberação do reforço, a lâmpada era desligada por 5 s; durante esse período, as pressões à barra não tinham consequência programada. Assim, foi estabelecido um tempo mínimo entre reforços de 5 s.

As sessões tinham duração de 30 min e aconteciam diariamente (de segunda à sexta-feira). O critério de finalização da fase foi de estabilidade da resposta: tendência estável na média de consumo por 15 sessões. Foram realizadas em total dezenove sessões.

Fase III: Teste de preferência entre etanol 20% (v/v) e água

Os animais foram submetidos a sessões diárias, durante oito dias. As duas barras tinham consequências programadas sob esquema concorrente CRF - CRF (CRF ET - CRF AG). Pressões em uma das barras tinham como consequência água, e pressões na outra barra tinham como consequência a solução de etanol na concentração de 20% (v/v). Foram realizadas oito sessões nesta fase. Em quatro delas, pressões na barra da direita eram seguidas de água e pressões na barra da esquerda de etanol, sendo o inverso nas outras quatro. As sessões tinham duração de 30 min.

É importante ressaltar que não foi mantido o intervalo de 5 s para as respostas reforçadas por álcool 20% (v/v) ou por água, isto é, não houve delimitação do tempo entre reforços.

Fase IV: Retorno à linha de base

Foram realizadas sete sessões, com 30 min de duração cada, de retorno à linha de base. As contingências, consequências e condições dessas sessões foram iguais às da Fase II.

Fase V: Teste de preferência entre etanol 20% (v/v) e Sacarina 0,25%

Assim como no teste preferência por água (Fase III), a sacarina 0,25% era disponibilizada como reforçador da pressão de uma das barras e, de forma concorrente, o etanol 20% (v/v) era disponibilizado como reforçador da pressão da outra barra. O esquema de reforço foi CRF –CRF (CRF ET – CRF SAC). Foi feita a alternância da localização das soluções por barra para evitar o viés de lateralidade, como explicado na Fase III.

Foram realizadas seis sessões, com duração de 30 min cada. Como na Fase III, não houve controle do tempo entre respostas.

Tabela 7 - Resumo de todas as fases e procedimentos do experimento 3

Esquema	Consequência	Nº. de sessões	Duração	Fase
CRF	Etanol 20% (v/v)	04 sessões	30 minutos	Fase I
CRF + timeout	Etanol 20% (v/v)	15 sessões	30 minutos	Fase II

Continua

Esquema	Consequência	Nº. de sessões	Duração	Fase
Concorrente CRF	Etanol 20% (v/v) e água	08 sessões	30 minutos	Fase III
CRF	Etanol 20% (v/v)	07 sessões	30 minutos	Fase IV
Concorrente CRF	Etanol 10% (v/v) e Sacarina 0,25% (w/v)	07 sessões	30 minutos	Fase V

Análise de dados

As variáveis dependentes analisadas e os tipos de análises foram semelhantes aos descritos para o Experimento II.

Resultados

Consumo em g/kg/min entre as fases

A figura 7 mostra a mediana do consumo de etanol (g/kg/min) durante as fases do Experimento 3. Houve aumento do consumo após a Fase I. Na Fase III, quando o etanol esteve concorrente com a água, o consumo foi similar ao da Fase II. Entretanto, na Fase III, quando o etanol esteve concorrente com a sacarina, houve diminuição do consumo. É possível observar que houve menor variabilidade de consumo nas Fases I e V, em que o consumo foi menor.

Figura 7 - Box (mediana, P25 e P75) & whiskers (P10 e P90) da média de consumo de etanol em g/kg/min durante todas as fases do Experimento 3.

A Tabela 8 mostra os efeitos relativos estimados para o consumo de etanol (g/kg/min) ao longo das fases do experimento. Na Fase I, o efeito relativo foi de 0,349, na Fase II houve aumento e o efeito foi de 0,610, na Fase III, 0,582, na Fase IV, 0,488 e na Fase V houve queda e foi de 0,471. As diferenças entre os efeitos relativos não foram estatisticamente significativas (QA = 2,452; gl = 1,850; p = 0,1174).

Tabela 8 - Efeito relativo estimado do consumo de etanol (g/kg/min) ao longo das fases do experimento 03.

I	II	III	IV	V
0,349	0,610	0,582	0,488	0,471

Taxa

Na Figura 8 é mostrado o diagrama *Box & Wiskers* das medianas da taxa de respostas sob o esquema concorrente, quando o etanol esteve concorrente com a água (Fase III) e

quando esteve concorrente com a sacarina (Fase V). É evidente no gráfico que a taxa por sacarina foi maior do que a taxa por etanol ou por água, que a taxa por estas últimas foi semelhante. De fato, como mostra a Tabela 9, apenas o efeito relativo da sacarina se afastou significativamente do acaso ($ER = 0,763$). Já o efeito relativo da taxa de respostas por etanol 0,487 na fase III e 0,39 na fase V, o da taxa de respostas por água foi de 0,36 na fase V. A análise estatística confirmou que o efeito relativo da taxa por sacarina foi maior do que do resto das soluções ($QA = 5,808$; $gl = 2,640$; $p = 0,003$).

Figura 8 - diagrama Box (mediana, P25 e P75) & *whiskers* (P10 e P90) das medianas da taxa de respostas sob o esquema concorrente, quando o etanol esteve concorrente com a água (Fase III) e quando esteve concorrente com a sacarina (Fase V).

Tabela 9 – Efeito relativo da taxa de respostas nas fases III e V, em que o etanol esteve concorrente com a água e a sacarina, respectivamente.

III - ET	V - ET	III - Água	V - SAC
0,487	0,390	0,360	0,763

A Figura 9 mostra as medianas da preferência por etanol nas Fases III (etanol concorrente com água) e V (etanol concorrente com sacarina). Quando concorrente com água, a mediana da preferência pelo etanol foi maior ($Md = 0,58$) do que quando concorrente com sacarina ($Md = 0,14$); isto é, na Fase III a escolha pelo etanol foi similar à escolha pelo seu concorrente, porém na Fase IV a escolha foi predominantemente pela sacarina. Também

se observa nessa figura aumento marcado da variabilidade nessa última fase em relação á fase anterior. Na Tabela 10, onde se mostra o efeito relativo das Fases III e V sobre a preferência, se observa que ambas as distribuições se afastam da distribuição ao acaso (0,617 na fase III, e 0,383 na fase V), porém a diferença não é estatisticamente significativa, embora tenha apresentado valor de p muito próximo de 0,05 ($QA = 3,252$; $gl = 1$; $p = 0,0714$).

Figura 9 - Box (mediana, P25 e P75) & *whiskers* (P10 e P90) das medianas da preferência por etanol nas fases III (etanol concorrente com água) e V (etanol concorrente com sacarina).

Tabela 10 – Efeito relativo da preferência por etanol nas fases III e V, em que o etanol esteve concorrente com a água e a sacarina, respectivamente.

III	V
0,617	0,383

Discussão

O objetivo deste experimento foi avaliar o consumo, taxa e preferência por etanol produzido pelo protocolo de autoadministração de Augier et al. (2014). Nesse trabalho, a média de pressões à barra do grupo não privado foi de $25 \pm 3,8$, e o consumo foi $0,76 \pm 0,12$ g/kg, nos dias 7 a 13 do experimento (Fase II). No presente estudo, a Fase II teve duração do dia 5 ao 19, isto é 7 dias a mais do que Augier et al. (2014); porém ao observar a média da taxa ($14,92 \pm 5,44$) e a do consumo ($0,66 \pm 0,24$) obtida entre os dias 7 e 13, é possível observar que a taxa e consumo obtidas neste estudo foram menores do que as obtidas naquele.

Augier et al. (2014) relataram que nesse período o número médio de pressões à barra ativa variou entre 10 e 40. Neste estudo, o número médio de pressões à barra ativa variou entre 0 e 49 no mesmo período. O número médio de pressões à barra foi menor do que a relatada por Augier et al. (2014).

Augier et al. (2014) não relataram a média de consumo durante a Fase I. Neste estudo, a média foi de 0,57 g/kg e desvio padrão de 0,28. Ou seja, a média de consumo foi acima da dose ativa de 0,3 g/kg..

Augier et al. (2014) afirmaram que o modelo de indução proposto por eles era de abuso e não de dependência, os critérios utilizados para fundamentar tal proposição foram (1) os animais não apresentaram níveis altos e escalada de consumo de autoadministração de etanol, e (2) não apresentaram níveis elevados de etanol no sangue. Entretanto, no presente trabalho, a análise do consumo demonstra que houve aumento da quantidade de etanol ingerida ao longo das fases, ainda que este aumento não tenha ocorrido para todos os sujeitos. Os animais começaram ingerindo cerca de 0,02g/kg/min; após as manipulações realizadas, eles consumiram 0,04g/kg/min. Porém essa mudança aconteceu da Fase I para a Fase II. Na Fase III, houve queda do consumo quando o etanol esteve concorrente com a água, esta queda persistiu na Fase IV, no retorno a linha de base, e acentuou-se quando o etanol esteve concorrente com a sacarina. Também não foi observado dentro da mesma fase aumento progressivo do consumo do primeiro ao último dia, e muitas vezes o contrário – diminuição progressiva do consumo, foi observado (dados não mostrados). Ou seja, os dados obtidos, neste sentido, são similares aos de Augier et al., (2014).

Nas Fases IV e V as taxas por etanol foram semelhantes, mas foi observada maior taxas de respostas por sacarina do que por água; portanto, os valores de preferência por etanol

obtidos são resultado das taxas mantidas pelos concorrentes e não pelo etanol. Quando o etanol esteve concorrente com a água, não houve diferença significativa entre a alocação das respostas na alternativa que dispensava etanol e a que dispensava água. Entretanto, quando o etanol esteve concorrente com a sacarina, houve maior preferência pela sacarina. Esse dado é consistente com o corpo de literatura que mostra que a qualidade do concorrente é determinante nas escolhas por drogas, e que soluções adoçadas funcionam como substitutos do etanol em modelos animais (Carrol, 1993; Colombo et al., 2005; Mormed, Colas e Jones, 2004, Lenoir et al 2007)

Em resumo, o procedimento de indução de autoadministração de Augier et al. (2014) produziu o consumo de doses com efeito sobre o sistema nervoso central, porém, não produziu preferência pelo etanol, nem diminuiu o valor reforçador dos concorrentes. Portanto, parece um bom método para se estudar autoadministração de etanol, mas não para se estudar processos de escolha em sujeitos dependentes.

Discussão geral

Os três experimentos apresentados neste trabalho demonstraram eficiência na indução da autoadministração de etanol, sem a necessidade da utilização do método fade-out de sacarose e fade-in de água de Samson (1986). Portanto, é possível dizer que os procedimentos foram efetivos em estabelecer o etanol como estímulo reforçador, uma vez que respostas de pressão à barra foram mantidas por esta consequência e as doses ingeridas foram condizentes com as doses de efeito no sistema nervoso central relatadas pela literatura (Williams-Hemby e Porrino, 1997). Apesar disto, notou-se um declínio do consumo de etanol ao longo do tempo em todos os experimentos, questão que deve ser investigada nos próximos estudos. Seria a autoadministração de etanol produzidas por esses protocolos um padrão comportamental transitório? Nesse sentido, o padrão de escalada de consumo, descrito como um dos critérios de dependência, não parece ser produzido por esses procedimentos.

Diferente do padrão de consumo, a preferência por etanol foi diferente entre os três experimentos. No Experimento 1, houve preferência quase exclusiva pela solução concorrente ao etanol, uma solução de sacarose. No Experimento 2 a preferência por etanol ficou em torno de 0,5 com ambos os concorrentes, água e solução de sacarina, isto é em valores que indicam indiferença. No Experimento 3 os valores da preferência por etanol quando concorrente com água indicaram indiferença, porém quando concorrente com a

solução de sacarina, as respostas se alocaram muito mais na alternativa que dispensava essa última, ainda que menos do que observado no Experimento 1.

Lenoir et al (2007) discutem que substâncias adocicadas, incluindo sacarina e sacarose, constituem poderosos reforçadores. De acordo com o autor, seu consumo produz estimulações no circuito de reforço do cérebro, que podem ser tão poderosas quanto o produzido por algumas drogas nos processos de dependência. Em consonância com a proposta de Lenoir et al (2007), em nosso laboratório foi realizado um estudo (Mangabeira, Mijares e Silva, 2015) que observou que a abstinência de açúcar em ratos expostos a longos períodos do seu consumo, produziu padrões de respostas em esquemas de reforço diferencial de baixas taxas de respostas comparáveis com as observadas em experimentos de abstinência de drogas.

Ainda de acordo com Lenoir et al. (2007), quando açúcares são concorrentes a drogas em modelos animais, geralmente produzem diminuição do consumo da droga. De fato, parece que a concorrência com soluções adoçadas são determinantes da taxa de respostas dos animais por etanol, mesmo quando são utilizados animais geneticamente modificados para preferência por essa droga. Por exemplo, Colombo et al. (2005) realizaram um estudo para avaliar o consumo de etanol quando concorrente à solução de sacarina em ratos geneticamente modificados para preferirem etanol. Depois de 8 semanas de livre acesso a etanol na caixa viveiro, foi disponibilizado acesso concorrente a diferentes concentrações de sacarina. Quando concorrente a solução de sacarina na concentração de 0,1% (w/v), todos os animais apresentaram diminuição entre 65 e 95% no consumo da solução de etanol, e apresentaram preferência pela solução de sacarina de aproximadamente 100%, semelhante à observada nos primeiro e terceiro experimentos deste trabalho. Mormed, Colas e Jones (2004) obtiveram também resultados de Colombo et al. (2005) com ratos geneticamente modificados para preferência por etanol; ainda, esses autores, relataram que quando o concorrente foi água, os animais preferiram o etanol, resultado diferente ao obtido nesta pesquisa.

Ao que parece, a preferência por soluções adoçadas também é observada quando o reforçador concorrente é cocaína, Lenoir, Serre, Cantin e Ahmed (2007) realizaram inúmeros estudos com ratos, em que manipulavam a história prévia da autoadministração intravenosa de cocaína, e realizaram testes de preferência em que a cocaína estava concorrente com a sacarina. Os autores observaram que os animais preferiam consistentemente a solução de

sacarina sobre a cocaína, mesmo com histórias longas de consumo e a despeito dos ratos terem evidenciado sensibilização motora e escalada do consumo de cocaína, indicadores característicos da dependência por cocaína.

Considerando a preferência de ratos por substâncias adoçadas em relação a etanol e outras drogas reportadas pela literatura, é possível afirmar que os procedimentos de Braconi et al. (2010), Simms et al., (2010) e Augier et al., (2014) tiveram efeitos diferentes sobre a preferência por etanol. Os resultados do Experimento 1 replicam os estudos aqui citados de outros autores com solução de sacarina: a solução de sacarose foi preferida ao etanol. Porém, não os observados no Experimento 2, uma vez que foi observada indiferença na preferência entre etanol e sacarina. A diferencia entre ambos os experimentos poderia ser explicada pelo tipo de reforçador: sacarose, no Experimento 1 e sacarina no Experimento 2. Isto é, poder-se-ia especular que propriedades intrínsecas da sacarose (por exemplo, calorias) fariam dela um estímulo reforçador mais poderoso do que a sacarina. Porém, os resultados do Experimento 3 – em que o concorrente foi sacarina, foram semelhantes aos do Experimento 1, e portanto não suportam essa hipótese. Portanto, parece que a explicação mais parcimoniosa é que os diferentes procedimentos produziram diferentes relações entre o comportamento e os reforçadores etanol e sacarose.

Assim, partindo da hipótese de que foram os procedimentos os determinantes das diferenças observadas entre os três experimentos, propomos aqui que estes se distinguem pelo seu efeito sobre o valor dos reforçadores concorrentes. Especificamente, distinguimos o trabalho do Simms et al., (2010) dos de Braconi et al., (2010) e Augier et al., (2014). Apenas o procedimento de Simms et al., (2010) parece ter alterado o valor reforçador da sacarina, e assim, foi o único em efetivamente ocasionar que uma solução adoçada concorrente fosse preferida tanto quanto o etanol. De acordo com Heyman (1996; 2009 e 2013) e com Kalivas e Volkow (2005), a diminuição do valor reforçador de estímulos concorrentes com a droga (e com os associado à droga) seria uma das características mais importantes do processo da dependência. Neste sentido, pode-se propor que a despeito do procedimento de Simms et al., (2010) não ter ocasionado maior preferência por etanol do que por sacarina, mostrou-se efetivo em produzir o fenômeno característico da dependência de diminuição do valor reforçador de concorrentes.

Alguns autores têm proposto que a preferência pela droga não deve ser usada como principal critério para avaliar dependência em modelos animais (Lenoir et al, 2007; Kearns et

al 2011; Becker e Ron, 2014; Sachis-Segura e Spanagel, 2006), outros indicadores como escalada do consumo, persistência no responder pela droga, persistência em responder sob controle dos estímulos associados com a droga, menor sensibilidade a punição dos comportamentos de busca e autoadministração de droga, devem também ser considerados.

Nesta pesquisa apenas avaliamos a autoadministração e preferência produzidas pelos procedimentos de administração de Braconi et al. (2010), Simms et al. (2010) e Augier et al. (2014). Da lista de indicadores citada acima, apenas a escalada de consumo poderia ser avaliada pelas observações aqui obtidas. Em relação a estas, nossos resultados indicaram que não houve escalada, e pelo contrário, como já apontado, houve diminuição do consumo ao longo das sessões, mesmo quando não são consideradas aquelas em que os esquemas concorrentes estavam em vigência. Portanto, parece que neste estudo esses procedimentos não foram eficientes para produzir aumento progressivo do consumo. No Experimento 2 observou-se em seis ratos aumento de consumo quando houve mudança no esquema de reforçamento de CRF para FR3. Portanto, é possível que o procedimento de indução desse experimento produza, de fato, escalada do consumo.

O motivo pelo qual o procedimento de Simms et al., (2010) produziu padrões de consumo e preferência diferentes aos dos de Braconi et al., (2010) e Augier et al., (2014) pode ser o tempo de exposição ao etanol utilizado pelo primeiro. Na revisão da literatura de estudos pré-clínicos de dependência, Kearns, Gomez-Serrano e Tunstall (2011) concluem que os resultados dos estudos pré-clínicos não são consistentes com a visão popular de que drogas, tais como a cocaína, causam dependência por serem reforçadores extraordinariamente fortes e irresistíveis. Os autores afirmam que a diferença entre os reforçadores (droga e não droga) consiste em outra variável que não seja algum tipo de força intrínseca do reforçador. A longa exposição à droga foi observada como um fator crítico de diferenciação entre esta e outros reforçadores. Neste trabalho, os animais foram expostos a etanol por 17 dias (Experimento 1), 67 dias (Experimento 2) ou 19 dias (Experimento 3) antes do primeiro teste de preferência. Isto é, a história com etanol dos animais do Experimento 2 foi mais de três vezes mais longa do que nos Experimentos 1 e 3. Portanto, a extensiva experiência com etanol parece ter sido uma variável relevante na determinação dos resultados aqui observados.

Becker e Ron (2014) discutem que, ao longo do tempo, o campo de estudo experimental do alcoolismo em infrahumanos foi se especializando para criar modelos que

fossem capaz de superar a tendência natural dos animais de não consumirem voluntariamente etanol. Cada modelo apresenta diferentes métodos e concepções de dependência química, sendo que cada modelo demonstra apenas uma parte do complexo fenômeno que é a dependência química. Além disto, cada modelo apresenta vantagens e desvantagens. Os autores concordam que um dos maiores desafios é o de produzir autoadministração de etanol em doses suficientes para produzirem efeitos tóxicos nos animais. Como mencionado, o três modelos foram eficientes em produzir a autoadministração de doses que produzem efeitos significativos no sistema nervoso central, portanto são adequados para esse fim; entretanto, apenas o modelo de Simms (2010) também reproduziu o fenômeno de diminuição de valor reforçador dos concorrentes, e possivelmente de escalada de consumo, mostrando, assim, ser conveniente para pesquisas cujo foco principal é o estudo da relação entre dependência e comportamento de escolha.

Por último, os resultados dos experimentos parecem indicar que o tempo de exposição ao álcool é uma variável importante a ser considerada em procedimentos de indução de dependência.

Referências Bibliográficas

American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, V Edition. Washington, D.C.: American Psychiatric Association.

Ahmed, S. H. (2005). Imbalance between drug and non-drug reward availability: a major risk factor for addiction. *European Journal of Pharmacology*. 526, 9-20.

Ahmed, S. H. (2010). Validation crisis in animal models of drug addiction: beyond non-disordered drug use toward drug addiction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 35, 172-184.

Ahmed, S. H., Guillem, K. e Vandaele, Y. (2013). Sugar addiction: pushing the drug-sugar analogy to the limit. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 16, 434-439.

Augier, E. Flanigan, M., Dulman, S. R, Pincus, A., Schank, R. J., Rice, C. K., Kejun, C., Heiling, M., Tapocik, D. J., (2014). Wistar rats acquire and maintain self-administration of 20 % ethanol without water deprivation, saccharin/sucrose fading, or extended access training. *Psychopharmacology*. 231, 4561-4568.

Bechara, A. (2005). Decision making, impulse control and loss of willpower to resist drugs: a neurocognitive perspective. *Nature Neuroscience*, 8, 1458-1463.

Becker, C. H., e Ron, D. (2014). Animal models of excessive alcohol consumption: Recent advances and future challenges. *Alcohol*, 48, 205-208.

Bell, R. L., Rodd, A. Z., Lumeng, L., Murphy, J. M., McBride, W., J. (2006). The alcohol-preferring P rat and animal models of excessive alcohol drinking. *Addiction Biology*. 11, 270-288.

Bernardes, A. T. M. (2014). Análise do comportamento de escolha por etanol e efeitos do tratamento com Ondansetrona de ratos criados em ambiente enriquecido e isolado. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação Psicologia Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo. São Paulo.

Braconi, S., Sidhpura, N., Aujla, H., Martin-Fardon, R., Weiss, F., Ciccocioppo, R. (2010). Revisiting Intragastric Ethanol Intubation as a Dependence Induction Method for Studies of Ethanol Reward and Motivation in Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 34, 538-544.

Carroll, M. (1993). The economic context of drug and non-drug reinforcers affects acquisition and maintenance of drug-reinforced behavior and withdrawal effects. *Drug and Alcohol Dependence*, 33, 201-210.

Falk, J. L. (1961). Production of polydipsia in normal rats by an intermittent food schedule. *Science*. 133, 195-196.

Ford, M. M. (2014). Applications of schedule-induced polydipsia in rodents for the study of an excessive ethanol intake phenotype. *Alcohol*, 48, 265-276.

Hasin, D. S., O'Brien, P. C., Auriacombe, M., Borges, G., Bucholz, K., Budney, A., Compton, W. M., Crowley, T., Ling, W., Petry, N. M., Schuckit, M., Grant, F. B. (2013). DSM-5 Criteria for Substance Use Disorders: Recommendations and Rationale. *The American Journal of Psychiatry*, 170, 834-851.

Hellms, M. C., Bell, L. R., Bennett, J. A., Davies, L. D., Chester, A., J., Kosten, A., T., Leeman, F. R., Panicker, S., Platt, M., D., Weiner, L., J., Edwards, S. (2015). The Importance of Animals in Advancing Research on Alcohol Use Disorders. *Alcoholism: clinical and experimental research*, 39, 575-578.

Heyman, G. M. (2009). *Addiction: a disorder of choice*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Heyman, G. M. (2013). Addiction: an emergent consequence of elementary choice principles. *Inquiry*, 56, 428-445.

Hyman, S.E., Malenka, R.C., Nestler, E. J. (2006). Neural Mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annual Review of Neuroscience*, 29, 565-598.

Kalivas, P. W., Volkow, N. D. (2005). The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *The American Journal of Psychiatry*, 162, 1403-1413.

Kearns, N. D., Gomez-Serrano, A. M., e Tunstall, B. (2011). A Review of Preclinical Research Demonstrating that Drug and Non-Drug Reinforcers Differentially Affect Behavior. *Curr. Drug Abuse Rev.* 4, 261-269.

Khanna, J. M., Kalant, H., Shah, G., Sharma, H. (1990). Comparison of Sensitivity and Alcohol Consumption in Four Outbred Strains of Rats. *Alcohol*, 7, 429-434.

Galesi, F. L. (2009). Análise comportamental do modelo animal de recaída *cue-induced*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação Psicologia Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo. São Paulo.

Galesi, F. L. (2014). Controle de estímulos e respostas ao estresse no modelo de recaída ao álcool *cue-induced*. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação Psicologia Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo. São Paulo.

Lenoir, M., Serre, F., Cantin, L., Ahmed, S. (2007). Intense Sweetness Surpasses Cocaine Reward. *PLoS ONE*, 8, 1-10.

Majchrowicz, E. (1975). Induction of Physical Dependence upon Ethanol and the Associated Behavioral Changes in Rats. *Psychopharmacologia*, 43, 245-254.

Mello, N. K. (1973). A Review of methods to induce alcohol addiction in animals. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1, 89-101.

Mormed, P., Colas, A., Jones, B. (2004). High ethanol preferring rats fail to show dependence following short- or long-term ethanol exposure. *Alcohol & Alcoholism*, 39, 183-189.

O'Brien, P. C., Childress, A. R., Ehrman, R., Robbins, R. J. (1998). Conditioning factors in drug abuse: can they explain compulsion? *Journal of Psychopharmacology*, 12, 15-22.

O'Brien, P. C., Gardner, E. L. (2005). Critical assessment of how to study addiction and its treatment: Human and non-human animal models. *Pharmacology & Therapeutics*, 108, 18-58.

Olmstead, M. C. (2006). Animal models of drug addiction: Where do we go from here? *The quarterly journal of experimental psychology*, 59, 625-653.

Piazza, V. P., Deroche-Gamonet, V. (2013). A multistep general theory of transition to addiction. *Psychopharmacology*, 229, 387-413.

Rosa, P. (2001). Análise não-paramétrica de dados ordinais com medidas repetidas. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Estatística, Universidade de São Paulo, São Paulo. São Paulo.

Samson H.H. (1986). Initiation of ethanol reinforcement using a sucrose-substitution procedure in food- and water-sated rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 10, 436– 42.

Sanchis-Segura, C., Spanagel, R. (2006). Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addiction Biology*, 11, 2-38.

Scheggi, M., Marchese, G., De Montis, G., M., e Gambarana, C. (2013). Influence of palatability on motivation to operate for caloric and non-caloric food in non food-deprived and food-deprived rats. *Neuroscience*, 236, 320-331.

Simms, A., J., Bito-Onon, J., J., Barlett, E., S. (2010). Long-Evans Rats Acquire Operant Self-Administration of 20% Ethanol Without Sucrose Fading. *Neuropsychopharmacology*, 35, 1453-1463.

Sussman, S., Sussman, A. N. (2008). Considering the definition of Addiction. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8, 4025-4038.

Sussmanm, S., Lisha, N., Griffiths, M. (2011). Prevalence of the Addictions: A Problem of the Majority or the Minority? *Eval Health Prof.*, 34, 3-56.

Tiffany, S. T. (2014). Consideration of a comprehensive animal model of addiction: The limitations of modeling a counterfeit condition. *Psychopharmacology*, 231, 3919-3920.

Wolffgramm, J. Heyne, A. (1995). From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. *Behavioral Brain Research*, 70, 77-94.

Willner, P. (1991). Behavioral models in psychopharmacology. In: P. Willner, Editor, *Behavioral models in psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives*, Cambridge, University Press, Cambridge.

Vanderschuren, L. J. M. J., Ahmed, S. H. (2013). Animal studies of addictive behavior. *Cold Spring Harbor Perspective in Medicine*, 3, 1-14.

Vendruscolo, L. F., Roberts, A., J. (2014). Operant alcohol self-administration in dependent rats: focus on the vapor model. *Alcohol*.48, 277-286.

APÊNDICE

APÊNDICE 01 – Resumo das observações dos sintomas de abstinência realizados durante a fase II do experimento 01.

Dia 01

Sujeitos	Acordado	Exploração do amb.	Saltos	Tremores de dentes
01	X	X	X	X
02	X	X	X	
03	X	X		
04	X	X		
05	X	X		X
06	X	X		
07	X	X		

Dia 02

Sujeitos	Acordado	Exploração do amb.	Saltos	Tremores de dentes
01	X	X	X	X
02	X	X		
03	X	X		

04	X	X
05	X	X
06		
07	X	X

Dia 03

Sujeitos	Acordado	Exploração do amb.	Saltos	Tremores de dentes
01	X	X		
02	X	X		
03	X	X		
04	X			
05	X	X		X
06	X	X		
07	X	X		

Dia 04

Sujeitos	Acordado	Exploração do amb.	Saltos	Tremores de dentes
01	X	X		X
02	X	X		
03	X	X		
04	X	X		
05	X	X		X
06	X	X		X
07	X	X		

Dia 05

Sujeitos	Acordado	Exploração do amb.	Saltos	Tremores de dentes
----------	----------	--------------------	--------	--------------------

01	X	X	
02	X	X	
03	X	X	
04	X	X	X
05	X	X	X
06	X	X	
07	X	X	